

SÉRIE A.
N° 3282

N° D'ORDRE
4154

THÈSES

PRÉSENTÉES A LA

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Jens HEDEGAARD

1^{re} THÈSE : L'Influence de l'histidine et ses métabolites sur la
biosynthèse des purines par *Escherichia coli*.

2^e THÈSE : Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 22 Avril 1959 devant la Commission d'Examen.

MM. WURMSER, *Président*.

M. LEDERER.

M^{lle} LE BRETON.

} *Examineurs.*

LONS-LE-SAUNIER
IMPRIMERIE MAURICE DECLUME

1959

SÉRIE A,
N° 3282

N° D'ORDRE
4154

THÈSES

PRÉSENTÉES A LA

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Jens HEDEGAARD

1^{re} THÈSE : L'Influence de l'histidine et ses métabolites sur la
biosynthèse des purines par *Escherichia coli*.

2^e THÈSE : Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 22 Avril 1959 devant la Commission d'Examen.

MM. WURMSER, *Président*.

M. LEDERER.

M^{lle} LE BRETON.

} *Examineurs.*

LONS-LE-SAUNIER
IMPRIMERIE MAURICE DECLUME

1959





Digitized by the Internet Archive
in 2026

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

PROFESSEURS

Doyen J. PÉRÈS.

G. JULIA	T Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	GALLIEN	T Embryologie.
FOCH	T Mécanique physique et expérimentale.	EICHORN	T Biologie végét. (P.C.B.)
DE BROGLIE	T Théories physiques.	DE CUGNAC	T Biologie végét. (P.C.B.)
PRENANT	T Anatomie et Histologie comparées.	M ^{lle} CAUCHOIS	T Chimie-Physique.
PÉRÈS	T Mécanique des fluides et applications.	THELLIER	T Physique du Globe.
M. CURIE	T Physique (S.P.C.N.)	L'HÉRITIER	T Génétique.
BARRABÉ	T Géologie structurale et géologie appliquée.	GRIVET	T Radioélectricité.
J. BOURCART	T Géographie physique et Géologie dynamique.	THIRY	T Mécanique générale.
PLANTEFOL	T Botanique.	DUBREIL	T Arithmétique et théorie des nombres.
GRASSÉ	T Evolution des êtres organisés.	QUELET	T Chimie organique.
PRÉVOST	T Chimie organique.	CAGNIARD	T Géophysique appliquée.
BOULIGAND	T Application de l'analyse à la Géométrie.	CHAMPETIER	T Chimie macromoléculaire.
CHAUDRON	T Chimie appliquée.	CUVILLIER	T Géologie structurale et Géologie appliquée.
WYART	T Minéralogie.	JUNG	T Pétrographie.
TEISSIER	T Zoologie.	TRILLAT	T Microscopie et diffraction électronique.
MANGENOT	T Biologie végétale.	WIEMANN	T Chimie organique structurale.
P. AUGER	T Physique quantique et relativité.	JACQUINOT	T Spectroscopie et physique céleste.
MONNIER	T Physiologie générale.	VASSY	T Physique de l'atmosphère.
PIVETEAU	T Paléontologie.	DESTOUCHES	T Théories physiques.
ROCARD	T Physique (E.N.S.).	M. PRUVOST	T Géologie.
H. CARTAN	T Mathématiques (E.N.S.).	AMIEL	T Chimie génér. (P.C.B.)
LAFFITTE	T Chimie générale.	HOCART	T Minéralogie.
FAVARD	T Géométrie supérieure.	J.-P. MATHIEU	T Physique (P.C.B.).
COULOMB	T Physique du globe.	COUTEAUX	T Biologie animale (P.C.B.).
M ^{lle} COUSIN	T Biologie anim. (P.C.B.)	MAY	T Biologie animale (P.C.B.).
CHRÉTIEN	T Chimie minérale.	CHOQUET	T Calcul différentiel et intégral.
P. DRACH	T Zoologie.	FELDMANN	T Biologie (P.C.B.).
KASTLER	T Physique (E.N.S.)	GUINIER	T Physique des solides.
EPHROSSI	T Génétique.	JOST	T Physiol. comparée.
WURMSER	T Biologie physico-chimique.	FORTET	T Calcul des probabilités.
RIVIÈRE	T Géologie (S.P.C.N.)	SCHWARTZ	T Calcul différentiel et intégral.
GAUTHERET	T Biologie végét. (P.C.B.).	CHOUARD	T Physiologie Végétale.
LUCAS	T Recherches physique.	MALAVARD	T Aviation.
A. THOMAS	T Biologie cellulaire.	BRELOT	T Calcul différentiel.
ARNULF	T Optique appliquée.	NORMANT	T Chimie organique.
MAX MORAND	T Enseignement de physique.	BENARD	T Chimie (P.C.B.)
SOLEILLET	T Physique.	BUVAT	T Botanique (E.N.S.)
FORTIER	T Mécanique expérimentale des fluides.	DUGUE	T Statistiques Math.
DANJON	T Astronomie.	GELOSO	T Chimie (S.P.C.N.)
LAPORTE	T Physique générale et Radioactivité.	SOULAIRAC	T Psychophysiologie.
JANET	T Mécanique analytique et mécanique céleste.	ULRICH	T Physiol. végétale.
PETIT	T Biologie maritime.	MARÉCHAL	T Optique théorique et appl.
QUENEY	T Météorologie et dynamique atmosphérique.	KIRRMANN	T Théories chimiques.
		CHADEFAUD	T Botanique.
		DESTRIAU	T Physique (M.P.C.).
		M ^{lle} LE BRETON	T Physiologie générale
		SALEM	T Mathématiques générales.
		LELONG	T Mathématiques générales.
		DEVILLERS	T Anatomie et Histologie comparées.
		EHRESMANN	T Topologie algébrique.

FRANÇON	T Physique (S.P.C.N.).	ÖLMER	T Energétique Générale.
GLANGEAUD.....	T Géographie physique et Géologie dynamique.	ROUAULT.....	T Physique générale.
GODEMENT	T Mathématiques (M.P.C.).	GAUTHIER.....	T Méc. appliquée
PISOT	T Calcul des probabilités.	BARCHEWITZ.....	Chimie physique.
E. ROCH	T Géologie.	BROSSEL	Physique atomique.
SCHATZMANN	Astrophysique.	BUSER	Biologie animale (P.C.B.).
TERMIER	T Paléontologie stratigra- phique.	CAMUS.....	Biol. vég. (P.C.B.).
ZAMANSKY	T Mathématiques générales.	CASTAING	Physique générale.
LENNUIER	Physique (M.P.C.).	CURIEN.....	Minéralogie et cristallographie.
RIZET	Génétique.	MOYSE	Physiologie végétale.
ROUTHIER	Géographie appliquée.	NOIROT	Evolution des êtres organisés.
M ^{me} TONNELAT ...	T Théories physiques.	PANNETIER	Chimie (S.P.C.N.).
DIXMIER	T Mathématiques (M.P.C.).	POSSOMPES	Biologie animale (P.C.B.).
SOUCHAY	T Chimie générale.	PULLMANN	Chimie théorique.
AIGRAIN	T Electrotechnique.	TEILLAC	Physique nucléaire et radioactivité.
BRUSSET	Chimie minérale.	TONNELAT	Biol. physico-chimique.
M. LEVY	Physique théorique.	VILLE	Econométrie.
LENORMANT	T Physiologie.	WILLEMART	Chimie (P.C.B.).
M ^{me} CHAIX	Chimie biologique.	DODÉ.....	T Chimie.
M ^{me} HUREL-PY ...	Biologie végétale (P.C.B.).	FREYMANN	T Physique (S.P.C.N.).
PIAUX	Chimie (P.C.B.).	GUINOCHET	T Biol. vég. (ORSAY).
BRUN.....	Mécanique expérimentale des fluides.	ROLLET	T Chimie (P.C.B.).
LEDERER.....	T Chimie des substances organiques naturelles.	M ^{lle} JOSIEN	T Chimie (P.C.B.).
M ^{me} DUBREIL.....	T Mathématiques	CHEVALLEY	T Géométrie algébrique et théorie des groupes.
M ^{me} LELONG.....	T Mathématiques (E.N.S.).	ARNOULT	T Physique (ORSAY).
BELLAIR	T Géologie (S.P.C.N.).	CHAPELLE	T Physique (P.C.B.).
COTTE ...	T Physique (M.P.C.).	DELANGE.....	T Mathématiques (ORSAY)
DUBOIS J. E.	T Chimie (S.P.C.N.).	DENY.....	T Mécanique théorique des fluides.
LAMOTTE	Zoologie (E.N.S.).	LUCAS G.....	T Géologie.
MICHEL ANDRÉ ...	T Chimie (S.P.C.N.).		

Secrétaire Général..... CH. MONIER.

A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE,

A MA MÈRE,

A MON MAÎTRE,
MONSIEUR LE PROFESSEUR JEAN ROCHE,

Professeur au Collège de France,
Membre de l'Académie de Médecine.

*qui a bien voulu m'accueillir
dans son laboratoire et a dirigé
mes recherches avec tant de
bienveillance, en me permettant
de les mener à bien. Qu'il veuille
bien trouver ici un témoignage
de mon respectueux attache-
ment et l'expression de mes
sentiments reconnaissants.*

A MONSIEUR NGUYEN-VAN THOAI,
Directeur à l'Ecole Pratique des Hautes Etudes.

*avec l'expression de ma pro-
fonde gratitude pour les conseils
précieux et pour l'amicale solli-
citude qu'il n'a cessé de me
témoigner au cours de mes
recherches.*

A MON JURY DE THÈSE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR R. WURMSER,

*qui a bien voulu me faire l'honneur
de présider cette thèse.*

MADemoiselle LE BRETON, PROFESSEUR,

MONSIEUR LE PROFESSEUR E. LEDERER.

AVANT-PROPOS.

Nos études à l'Ecole Polytechnique Supérieure Royale du Danemark terminées, nous avons cherché à élargir nos connaissances de Chimie biologique, et notre Professeur de Biochimie et de Nutrition à Copenhague, Monsieur Henrik DAM, Prix Nobel, nous a alors vivement conseillé de poursuivre des études à Paris, au Collège de France, dans le laboratoire de Monsieur le Professeur Jean ROCHE.

Grâce au soutien de nos maîtres danois de l'Ecole Polytechnique, nos études en France étaient d'abord subventionnées par des fondations scientifiques danoises. Par la suite, nos recherches ont été faites à titre d'attaché de recherches au Centre National de la Recherche Scientifique. Nous adressons nos remerciements aux fondations danoises ainsi qu'au Centre National de la Recherche Scientifique.

Nous devons la publication du présent travail à des allocations généreuses de l'*Ecole Polytechnique de Copenhague* et de *Statens Almindelige Videnskabsfond, Copenhague*. Aussi, nous prions cette dernière fondation ainsi que l'Ecole Polytechnique du Danemark, en la personne de son Recteur, Monsieur le Professeur Anker ENGELUND, de trouver ici l'expression de notre profonde gratitude.

INTRODUCTION.

L'importance capitale des nucléotides et des nucléoprotéines dans le développement et l'organisation des systèmes biologiques a suscité l'intérêt que portent aujourd'hui les biochimistes à la biosynthèse des purines.

Les bases puriques sont, avec les bases pyrimidiques, l'acide phosphorique et les pentoses, les constituants des acides nucléiques et leur étude a, de ce fait, une incidence directe sur les recherches consacrées aux virus, aux corps chromogènes et à la biosynthèse des acides nucléiques. On retrouve également des purines dans plusieurs coenzymes comme, par exemple, le diphosphopyridine nucléotide (DPN), le triphosphopyridine nucléotide (TPN), le coenzyme du ferment jaune, l'adénine-flavo-dinucléotide, et c'est sous la forme d'une purine, l'acide urique, que les oiseaux excrètent le déchet de leur métabolisme azoté.

Les travaux consacrés aux purines, à leur biosynthèse, à leur incorporation dans les acides nucléiques, à leur interconversion et à leur dégradation enzymatique sont très nombreux.

Dans le cadre des recherches, déjà entreprises au Laboratoire de Biochimie Générale et Comparée du Collège de France, sur le métabolisme des corps imidazoliques, en particulier sur la dégradation enzymatique de la L-histidine, nous avons été amenés à nous intéresser particulièrement à la biosynthèse des purines. En effet, celles-ci renferment un noyau imidazolique, comme l'histidine, et il nous a paru particulièrement intéressant, dans l'esprit d'une recherche de biochimie comparée, d'étudier dans

quelle mesure l'histidine et ses métabolites peuvent participer à la formation des purines.

Dans les chapitres suivants, nous nous proposons tout d'abord :

1°) de passer en revue les principaux travaux, relatifs à la formation biologique des purines, en mettant l'accent sur les problèmes qui restent encore à résoudre ;

2°) d'exposer les résultats de nos propres recherches sur la *biosynthèse des bases puriques*, par une souche d'*Escherichia coli*.

Travaux antérieurs sur la biosynthèse des purines

Les premières recherches sur la biosynthèse des purines, ont surtout été réalisées « in vivo » chez des mammifères ; elles ont porté sur le rôle des précurseurs directs que pourraient jouer des corps possédant une structure voisine de celle des purines. Les résultats, basés sur la mesure de l'excrétion de l'acide urique et de l'allantoïne [3, 114, 162, 239, 321], n'ont cependant pas donné de résultats précis et c'est seulement dans les dernières années, grâce à l'utilisation de corps marqués et de techniques nouvelles, que l'on a commencé à pouvoir établir des schémas plus satisfaisants sur la biosynthèse des purines.

I. — UTILISATION DE PRÉCURSEURS SIMPLES DANS LA BIOSYNTHÈSE DES PURINES.

1a. — Incorporation de l'azote ammoniacal.

Les essais de BARNES et SCHOENHEIMER [13], qui administraient du $N^{15}H_4Cl$ à des rats et à des pigeons, montrent clairement que l'*azote ammoniacal* est rapidement incorporé dans les purines des acides nucléiques et peut être retrouvé dans les excréta (acide urique pour le pigeon, allantoïne pour le rat) (voir formules page 124). De semblables travaux [10, 127], plus récents, réalisés avec des œufs et des embryons d'oursins et avec des bactéries (*Escherichia coli*), établissent que l'utilisation de l'azote ammoniacal dans la biosynthèse des purines est probablement générale.

1b. — Utilisation de la glycine.

Certaines des toutes premières recherches sur la purinogénèse [41, 258, 271] avaient déjà indiqué l'existence d'un rapport étroit entre la glycine et l'acide urique ; mais des résultats plus récents [79] ont soulevé à nouveau des doutes à cet égard. Cependant, BUCHANAN et ses collaborateurs, étudiant l'incorporation d'un certain nombre de molécules simples (voir page 15) dans l'acide urique ont découvert — quoique d'une manière indirecte d'abord, en utilisant $N^{15}H_4Cl$ — que le carbone α -aminé de la glycine est certainement à la source du carbone-C-5 de l'acide urique [47, 48, 270] ; ils ont également démontré que le carbone carboxylique de la glycine est retrouvé dans la position C-6 dans l'acide urique. D'autres résultats, obtenus également avec des extraits de foie de pigeon, ont confirmé cette utilisation du carbone α -aminé de la glycine (C-5 de l'acide urique) [135]. L'incorporation, chez l'homme, de l'azote de la glycine dans l'acide urique (N-7) a été mise en évidence par SHEMIN et RITTENBERG [258].

Des études poursuivies avec de la levure en croissance [66] et avec *Aerobacter aerogenes* [281] ont établi l'incorporation intégrale de la glycine dans l'adénine et la guanine des acides nucléiques de ces organismes. Nous disposons actuellement d'une vaste documentation, établissant avec certitude l'intégration sans aucun changement des liaisons -N-C-C- de la glycine, respectivement dans les positions N-7, C-5, C-4 de la molécule purique, aussi bien chez les mammifères [66, 68] et chez les oiseaux [41, 100, 101, 153, 154, 155, 156, 249, 250, 252] que chez les microorganismes [65, 66, 281].

En liaison avec ces faits, il convient de signaler les rapports étroits qui existent entre la glycine et d'autres corps métaboliquement importants, comme l'acide acétique et le glucose [8, 82, 274], l'éthanolamine et la sérine [82], — ce qui donne à la glycine une position clef dans un grand nombre de réactions biologiques et relie — quoique d'une

manière indirecte — la biosynthèse des purines à celle de beaucoup d'autres corps également très importants pour les organismes.

1c. — Utilisation du formiate.

De nombreux travaux sur l'incorporation dans les purines de formiate- C^{14} [65, 115, 252, 271, 293, 306], ont montré que le carbone du groupement formyle, dit actif, sert d'une manière assez directe à la biosynthèse des purines et spécialement à celle de l'adénine. Par dégradation partielle et spécifique de l'acide urique, on a pu établir que l'unité de carbone, « C-1 », « formyle actif » ou « formiate actif », représentée dans les milieux biologiques par le formiate, le méthanol, le méthanal, le carbone- β de la sérine, le groupement méthyle de la méthionine, etc..., est incorporée dans la molécule des purines en position C-2 et C-8. Ces réactions semblent générales pour un grand nombre d'organismes, depuis les mammifères [115, 124, 293, 306] et les oiseaux [89, 156, 211, 249, 250], jusqu'aux microorganismes [18, 309, 311]. Nous discuterons plus tard, en exposant l'influence des dérivés de l'acide folique sur la biosynthèse des purines, le mécanisme de la réaction de transformylation.

1d. — Utilisation du gaz carbonique, CO_2 .

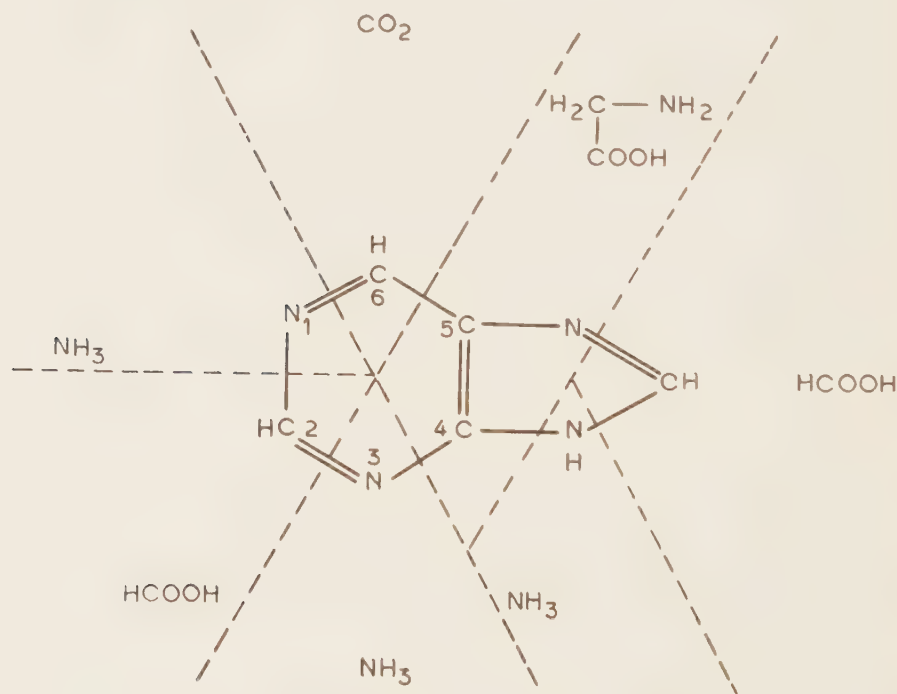
Le gaz carbonique a été envisagé, lui aussi, comme un précurseur d'une partie de la molécule purique. Des essais ont en effet démontré que le carbone de CO_2 [153, 156, 252], est à l'origine du carbone C-6 de l'acide urique. L'école de BUCHANAN a également pu constater [252] — en mettant en œuvre des extraits de foie de pigeon — que les proportions moléculaires entre les précurseurs carbonés des purines, (dans le cas particulier de l'hypoxanthine) sont, au moment de leur incorporation dans une base purique :

Glycocolle	1
Formiate	2
CO_2	1

Ces résultats résument l'ensemble des origines des atomes de carbone dans la structure des purines.

En ce qui concerne celles des atomes d'azote, nous avons déjà mentionné que l'azote α -aminé de la glycine est utilisé dans la position N-7 et que l'azote ammoniacal peut servir de précurseur aux atomes N-1, N-3, N-9 [10, 13, 127].

A partir de l'ensemble des résultats obtenus sur l'utilisation des précurseurs simples dans la biosynthèse des purines, il a été possible d'établir le premier schéma que voici, sur les origines de tous les atomes de la molécule purique [248] :



2. — PARTICIPATION DE MOLÉCULES PLUS COMPLEXES A LA BIOSYNTHÈSE DES PURINES.

Depuis les premières recherches démontrant l'impossibilité pour l'urée [13], les pyrimidines [215], l'arginine [30, 31, 32], l'histidine [287], à s'incorporer *intégralement* dans les purines, beaucoup d'autres recherches ont été poursuivies dans le but d'examiner les possibilités pour ces corps de ne participer à la biosynthèse des bases puriques que partiellement.

2a. — Utilisation des acides glutamique et aspartique et de la glutamine.

SONNE et collaborateurs [272] ont tout récemment mis en évidence, au moyen d'extraits de foie de pigeon, que, pour chaque atome d'azote provenant de la glycine, l'on retrouvait approximativement un atome d'azote provenant soit de l'acide aspartique, soit de l'acide glutamique dans les purines obtenues. Des expériences réalisées avec de la glutamine ont montré que pour une molécule de glycine incorporée dans l'hypoxanthine deux atomes d'azote provenant du groupement amide de la première sont utilisés. Un de ces deux équivalents d'azote amidé était incorporé dans la position N-9 et le deuxième est retrouvé avec l'azote provenant soit de l'acide aspartique, soit de l'acide glutamique, dans la fraction contenant les atomes d'azote N-1 et N-3.

Faute de méthodes de dégradation partielle et spécifique de l'acide urique, il était alors encore impossible de distinguer entre N-1 et N-3, mais plus tard, le même groupe de chercheurs [160] et SALZMAN et collaborateurs [244] ont publié des résultats établissant d'une manière définitive les origines de l'azote de la molécule purique, — origines jus-

qu'à ce moment attribuées à un réservoir biologique d'ammoniaque. Leurs résultats se résument ainsi :

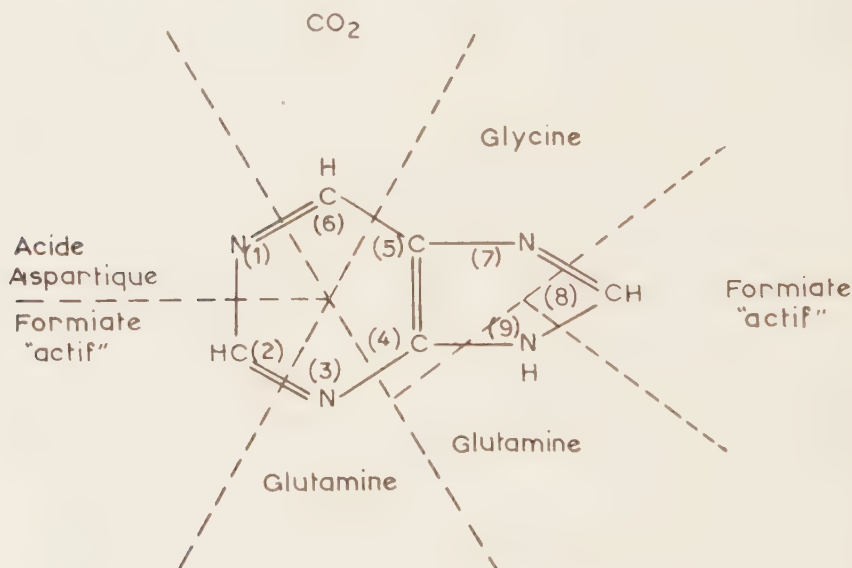
N-1 : provient de l'acide aspartique

N-3 : provient de la glutamine

N-7 : provient de la glycine

N-9 : provient de la glutamine.

L'ensemble de ces études nous permet alors de mettre à jour le schéma de SCHULMAN [248] sur les origines des différents atomes constituant la molécule purique :



2b. — Utilisation de l'histidine.

Malgré les résultats d'ACKROYD et HOPKINS [3], de YOUNG et coll. [321], et de ROSE et COOK [239], qui semblaient établir un rapport étroit entre l'histidine et l'allantoïne, nous avons aujourd'hui la certitude [287] que l'histidine ne s'incorpore pas telle quelle, intégralement, dans les purines. Par contre, nous savons actuellement qu'au moins le carbone-C-2 du noyau imidazolique peut être utilisé [228, 269,

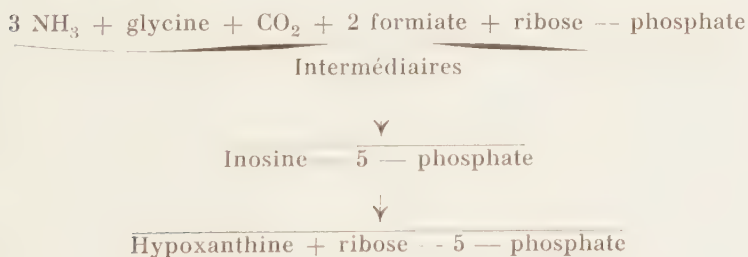
275, 282, dans la biosynthèse des bases puriques, et plusieurs travaux tout récents permettent de croire que l'utilisation de l'histidine ne se borne pas à une telle fourniture de radical formyle. Nous exposerons ce problème de façon plus détaillée à la fin de cette introduction.

3. — MÉCANISME DE LA BIOSYNTHÈSE DES PURINES.

Parallèlement à toutes les recherches sur l'utilisation de précurseurs simples dans la purinogenèse, de nombreux travaux ont éclairci le mécanisme de cette réaction, pour mettre en évidence ses différentes étapes et pour en isoler éventuellement des intermédiaires.

3a. — Mécanisme général.

Au cours des dernières années, GREENBERG et ses collaborateurs ont publié toute une série d'expériences [100, 101, 102] indiquant clairement que la formation de l'hypoxanthine par des préparations de foie de pigeon a lieu avec des dérivés de ribose-phosphate comme intermédiaires ; les résultats obtenus se résument par le schéma suivant :



3b. — Intermédiaires dans la biosynthèse des purines.

3b A. — 5(4)-amino-4-(5)-imidazolecarboxamide.

La découverte faite par STETTEN et FOX [77, 277] de la présence d'une amine diazotable, mais non-acétylable,

dans des cultures d'*Escherichia coli* inhibées par les sulfamides, a été d'une importance capitale pour la compréhension de la biosynthèse des purines. Ce corps identifié à la 5(4)-amino-1-(5)-imidazolecarboxamide [260] a très rapidement été relié à la biosynthèse des purines (voir formule page 125).

Au début, de nombreux travaux semblaient cependant montrer que la 5(4)-amino-4-(5)-imidazolecarboxamide (AICA) (voir page 125) n'était pas un produit du métabolisme normal [24, 92, 100, 102] : aussi, malgré sa structure très proche de celle de l'hypoxanthine (voir formule page 123) n'était-elle pas considérée comme un intermédiaire naturel dans la formation des bases puriques. Aujourd'hui, nous avons la preuve que l'AICA (compris dans son riboside ou son ribotide) constitue l'un des intermédiaires normaux de la formation de l'acide inosinique [251, 268] et qu'il s'incorpore dans les purines des acides nucléiques d'un très grand nombre d'organismes.

3b Aa. — INCORPORATION DE L'AICA DANS LES PURINES CHEZ LES DIFFÉRENTS ORGANISMES.

Les travaux qui ont mis en évidence l'incorporation de l'AICA dans des bactéries sont nombreux. Les premiers ont été réalisés avec *Escherichia coli* [17, 260] mais des souches des familles bactériennes de *Staphylococcus* [1, 2], de *Lactobacillus* [301] et de *Mycobacterium* [320] ont également conduit à des résultats concluants à ce sujet.

Déjà en 1949, FRIS et ses collaborateurs [81] ont pu montrer l'utilisation de l'AICA par des mutants d'*Ophiostoma*, exigeant de l'adénine, et tout récemment, STEGWE [276] a communiqué les résultats d'une étude plus poussée avec ce même microorganisme.

Plusieurs groupes de chercheurs ont mis en évidence l'incorporation de l'AICA dans les purines des acides nucléiques des levures [309, 311] et des travaux récents poursuivis sur des amibes, *Entamoeba histolytica* [199], sur la souche bactérienne *Staphylococcus flavocyaneus* [1, 2] et

sur le prostit, *Crithidia fasciculata* [2] ont montré que non seulement la 5(4) - amino - 4(5) - imidazolecarboxamide (AICA), mais aussi la 5 (4)-amino-4(5)-imidazolecarboxamidine sont incorporées dans les purines de ces organismes. En ce qui concerne l'utilisation du dernier de ces corps, les résultats obtenus [1, 2, 199] semblent indiquer une formation d'adénine plus directe que celle qui passe par la formation préalable de l'hypoxanthine et il est intéressant de remarquer que le besoin de ces microorganismes en purines ou en 5 (4)-amino-4(5)-imidazolecarboxamidine va de pair avec celui en méthionine, en histidine et en un dérivé de l'acide folique.

Chez le Pigeon *in vivo*, l'AICA est rapidement incorporée dans l'acide urique [251] et de nombreux travaux poursuivis sur des mammifères, tout spécialement avec des rats [232, 234, 288] et des souris [56, 57, 175, 300], mais aussi avec l'homme [253, 254], confirment l'utilisation de la 5(4)-amino-4(5)-imidazolecarboxamide pour la formation de l'acide inosinique; ils permettent de généraliser la notion de cette utilisation.

Si la 5(4)-amino-4(5)-imidazolecarboxamide est rapidement incorporée dans les purines de multiples organismes *in vivo*, il n'en est pas toujours de même *in vitro* [102]. Comme il a été mentionné plus haut, la formation de l'hypoxanthine a lieu par l'intermédiaire d'un dérivé ribose-phosphorique, et divers travaux, surtout ceux de l'école de BUCHANAN [46, 73, 104, 147, 148, 250, 251, 310, 311], ont montré que l'incorporation de l'AICA dans les purines passe également par la formation d'un nucléotide. Ce fait est en accord avec les résultats de GREENBERG [103, 112] et Gots [93], établissant que la plus grande partie de l'AICA, formée dans un milieu de culture d'*Escherichia coli* inhibé par les sulfamides, se trouve sous forme d'un riboside provenant sans doute de l'hydrolyse du ribotide correspondant [108].

Tout récemment, SHAW [257] a réussi la formation chimique de l'AICA-riboside à partir de l'adénosine-triacétate et LOVE [163] a réalisé l'accumulation du AICA-riboti-

de formé à partir de précurseurs simples, dans un extrait acellulaire d'un mutant d'*Escherichia coli*, tandis que des expériences similaires, réalisées avec un extrait de foie de pigeon, ont échoué [250].

Des recherches sur l'incorporation de l'AICA dans les purines, *in vitro*, ont été poursuivies spécialement avec des extraits plus ou moins purifiés de foie de pigeon [46, 73, 104, 147, 148, 206, 207, 208, 209, 250, 251, 310, 311], mais des résultats positifs ont également été obtenus avec le foie et des tumeurs de rats [189, 190, 288], ainsi qu'avec des extraits de *Lactobacillus arabinosus* [301].

3b Ab. — MÉCANISME DE L'INCORPORATION DE L'AICA DANS L'ACIDE INOSINIQUE.

Le mécanisme des réactions : *AICA* $\longrightarrow$ *AICA-riboside* $\longrightarrow$ *AICA-ribotide* $\longrightarrow$ *Acide inosinique* a également fait l'objet de plusieurs études. Ainsi la formation d'AICA-riboside à partir de la base libre a été réalisée par KORN et collaborateurs [147, 148] travaillant avec une nucléoside phosphorylase de foie de bœuf [131], et par BEN ISHAI et collaborateurs [16] avec *Escherichia coli*, tandis que la phosphorylation d'AICA-riboside en AICA-ribotide a été démontrée avec un extrait dialysé de foie de pigeon et avec un autolysat de levure ordinaire [104].

La transformylation : *AICA-ribotide* $\longrightarrow$ *Acide inosinique* a été étudiée par un grand nombre de chercheurs, et le système enzymatique responsable de cette réaction a été purifié à partir d'un extrait brut de foie de pigeon [73]. Le mécanisme de la réaction a également été déterminé [46, 73, 75, 76, 267] ; il y a lieu de mentionner ici que le dérivé formylé de l'AICA, la 5(4)-formamido-4(5)-imidazolecarboxamide, est deux fois plus actif que l'AICA elle-même comme précurseur des purines dans certains mutants d'*Escherichia coli* [17, 23].

C'est au cours de ces travaux qu'a été reconnu le rôle capital que jouent les dérivés de l'acide folique comme cofacteurs dans la biosynthèse des purines.

3b Ac. — L'ACIDE FOLIQUE ET SES DÉRIVÉS, NÉCESSAIRES AUX TRANSFORMYLATIONS.

Ce sont tout d'abord les expériences de WOOD [314, 315, 316] sur le rôle de l'acide para-amino-benzoïque, PABA, qui ont conduit indirectement à la notion de transfert enzymatique d'« unité de carbone ». Très vite on a découvert que le véritable cofacteur n'était pas le PABA, mais des molécules plus complexes, faisant partie du groupe des vitamines B et comportant une molécule de PABA, il s'agissait des dérivés de l'acide folique (voir formule page 129). Ainsi, des expériences sur l'incorporation de formiate- C^{14} dans l'acide inosinique [46, 101] ont mis en évidence qu'un cofacteur essentiel à la réaction se trouvait dans un extrait bouilli de foie, mais que le facteur citrovorum était capable de jouer ce rôle essentiel.

Ce fait a conduit un grand nombre de chercheurs à étudier plusieurs dérivés de l'acide folique susceptibles d'exercer cet effet de cofacteur [26, 28, 142, 144, 226, 260, 304]. Récemment [111, 129] on a pu préciser que le véritable cofacteur était l'acide tétrahydrofolique, FAH_4 , lequel joue vraisemblablement le rôle de transporteur de formyle. En effet JAENICKE [129] a isolé et identifié l'acide formyle-tétrahydrofolique, $N^{10}-CHOFAH_4$ comme produit de la réaction :



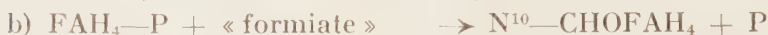
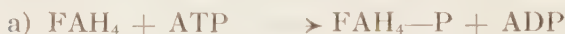
En outre, les expériences de GREENBERG et de ses collaborateurs 106, 107, 109, 111 sur la transformylation sur AICA-ribotide :



ont établi que la réaction dépend de la présence non seulement de FAH_4 et de « formyle actif », mais aussi de l'ATP, de Mg^{++} , de l'anaérobiose stricte et de l'éthylènediaminetétraacétate, ce dernier complexant les ions de métaux lourds qui catalysent l'oxydation chimique de FAH_4 .

Des travaux publiés tout dernièrement ont permis d'établir le mécanisme de formation de l'acide formyle-tétra-

hydrofolique, N^{10} —CHOF AH_4 , et démontré que la réaction globale de JAENICK [129] comporte deux étapes [308] :



La formation du dérivé phosphorylé de l'acide tétrahydrofolique, $\text{FAH}_4\text{—P}$, a été mise en évidence par spectrophotométrie et par chromatographie, mais nous ne connaissons pas, à l'heure actuelle, sa constitution exacte.

Les principaux arguments en faveur de l'hypothèse que le N^{10} —CHOF AH_4 , ou tout au moins un dérivé très proche de celui-ci, est le véritable cofacteur du système enzymatique transformylant, résident dans les faits suivants [111] :

A. N^{10} —CHOF AH_4 synthétique transformyle sur l'AICA-ribotide, sans ATP ;

B. N^{10} —CHOF AH_4 peut, comme le produit naturel présent dans les extraits de foie, être transformé en dérivé imidazolium correspondant, par acidification anaérobie ;

C. N^{10} —CHOF AH_4 s'oxyde comme le produit naturel en N^{10} —CHOF AH_2 ;

D. N^{10} —CHOF AH_4 synthétique se transforme chimiquement, comme le composé biologique, en citrovorum facteur, CF, (pH alcalin, anaérobiose, 60 minutes à 100°).

L'étude de la réaction transformylante ne s'est pas bornée à la seule mise en évidence du mécanisme :

AICA-ribotide $\longrightarrow$ *Acide inosinique*, mais a permis d'établir et expliquer les interconversions : *Homocystéine* $\longrightarrow$ *Méthionine* [21, 62] et *Glycine* $\longrightarrow$ *Sérine* [25, 26, 27, 28, 29, 129, 142, 143, 144, 318, 319]. En effet, JAENICK [129] a pu montrer que le N^{10} —CHOF AH_4 se forme au cours de la conversion de la sérine en glycine, en présence de TPN :



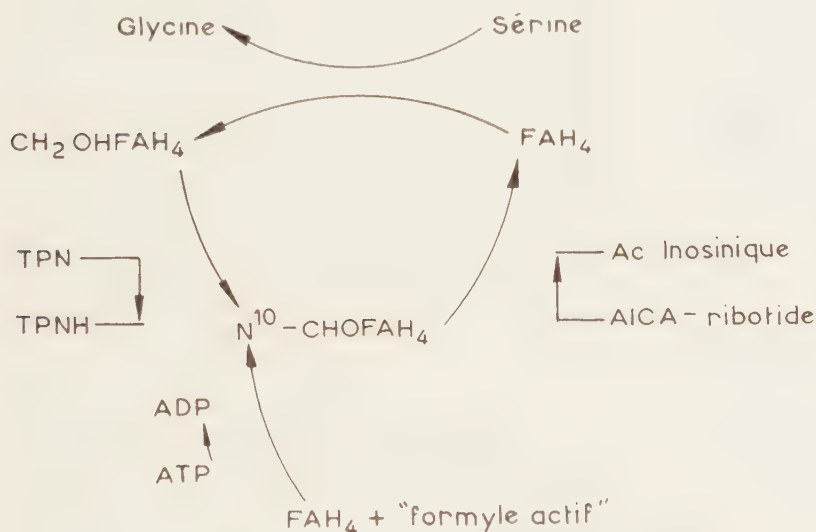
et plus tard [111, 130] on a obtenu des renseignements plus précis sur le mécanisme de cette réaction :



Le dérivé, 10-hydroxyméthyltetrahydrofolique apparaît ainsi comme un intermédiaire entre FAH_4 et $\text{N}^{10}\text{-CHOFAH}_4$ [214].

Un très grand nombre de travaux ont contribué également à la compréhension de l'utilisation plus générale du formiate et de certains donateurs de formyle dans la formation des dérivés de l'acide folique et, par là, dans la biosynthèse des purines.

L'ensemble des résultats obtenus sur les transformylations et sur les cofacteurs, indispensables à ces réactions, est résumé dans le schéma suivant [110] :



3b B. — Glycinamide-ribose et Formylglycinamide-ribose, intermédiaires dans la formation de l'AICA-ribose.

Déjà en 1953, GREENBERG a proposé un premier schéma expliquant la formation de l'AICA-ribose, à partir des dérivés de la glycine, d' NH_3 , et de ribose-phosphate [105]. En effet, si l'on admet que les sulfamides inhibent non seulement la transformylation du carbone-C-2, mais aussi

celle du carbone, C-8, il paraît logique que la formation de l'AICA-riboside et -ribotide s'arrête au fur et à mesure du développement de la culture bactérienne et lorsque le manque de cofacteur se manifeste ; les précurseurs de l'AICA commencent alors à s'accumuler.

Les résultats de GREENBERG, obtenus avec de la glycine- C^{14} , et une souche d'*Escherichia coli*, sont en parfait accord avec cette argumentation [105] ; plus tard le même groupe de chercheurs [88, 90, 91, 213] a montré par des protéines solubles extraites de poudre acétonique de foie de pigeon — la formation de ribotides de glycinamide et de formylglycinamide. Le mécanisme de cette formation — avec la 5-phosphoribosylamine (PRA) comme intermédiaire — a également été précisé [86, 149, 150, 231, 298, 299], nous permettant de schématiser les réactions comme suit :



(voir table d'abréviations page 131).

La participation de ces ribotides de glycinamide et de formylglycinamide à la biosynthèse des purines a été démontrée par les écoles de GREENBERG [87, 88, 212] et de BUCHANAN [118, 119]. Ces dernières années des renseignements importants sur le mécanisme des réactions qui transforment le formylglycinamide-ribotide en acide inosinique, via le 5-amino-1-imidazolecarboxamide-ribotide ont également été obtenus.

3b C. — Intermédiaires entre le formylglycinamide-ribotide et l'AICA-ribotide.

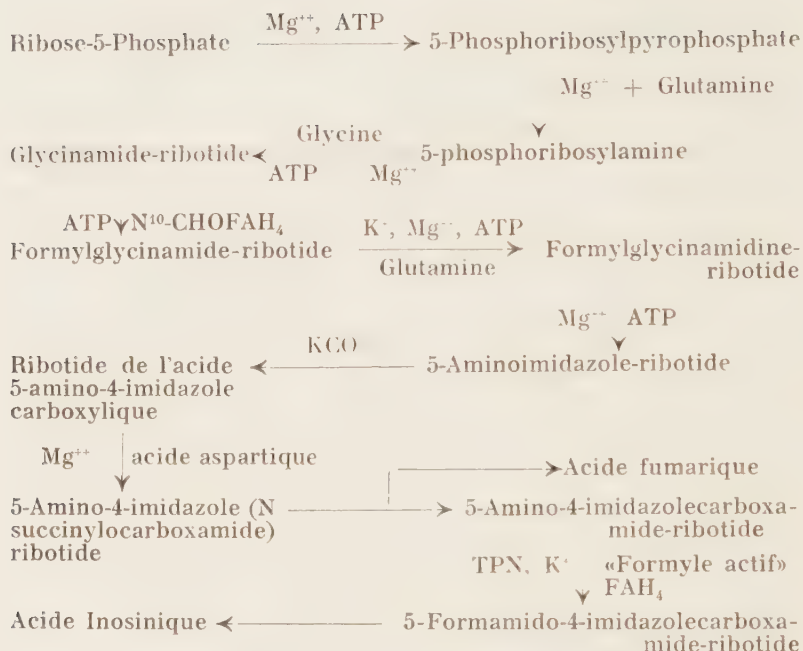
Nous savons aujourd'hui que le formylglycinamide-ribotide est transformé en formylglycinamidine-ribotide par un enzyme du foie de pigeon, en présence de glutamine,

de K^+ , de Mg^{++} , et d'ATP [42, 159, 161, 179]. Le formylglycin-amidine-ribotide est ensuite cyclisé en 5-aminoimidazole-ribotide [158], également par un extrait de foie de pigeon et en présence de Mg^{++} et d'ATP.

Il est intéressant de mentionner, en liaison avec cette mise en évidence de 5-amino-imidazole-ribotide comme intermédiaire dans la biosynthèse des purines, les travaux de LOVE et GOTS [163, 164], de MOAT et collaborateurs [193] et de CHAMBERLAIN et RAINBOW [54], lesquels ont mis en évidence, respectivement par *Escherichia coli*, par *Saccharomyces cerevisiae* et par des souches de levures, un aminoimidazole, précurseur biologique de l'AICA-ribotide et de l'hypoxanthine dans ces organismes.

La transformation du 5-aminoimidazole-ribotide en AICA-ribotide, et le mécanisme des réactions qu'elle implique ont été particulièrement étudiés par LUKENS et BUCHANAN [166] et par MILLER, LUKENS et BUCHANAN [188]. Les travaux de ces auteurs ont montré que le 5-aminoimidazole-ribotide donne naissance, en présence de bicarbonate et d'un enzyme de foie de pigeon, à l'acide 5-amino-4-imidazolecarboxylique-ribotide. En présence de Mg^{++} , d'ATP, d'acide aspartique, et d'un enzyme de foie de pigeon ou de poulet, de *Salmonella typhimurium*, d'*Escherichia coli*, ou de *Neurospora crassa*, il se forme, à partir de ce dernier le ribotide de 5-amino-4-imidazole (N-succinyl-carboxamide) lequel, après hydrolyse enzymatique, produit le 5-amino-4-imidazolecarboxamide-ribotide (AICA-ribotide) et l'acide fumarique. La réaction transformant l'AICA-ribotide en acide inosinique a déjà été examinée en détail.

Les données que nous venons d'exposer nous permettent de résumer l'ensemble des problèmes enzymatiques de la biosynthèse des purines et de préciser les différentes étapes de celle-ci à partir de molécules relativement simples [44, 52]. Le schéma suivant rend compte du rôle des différents intermédiaires, et des besoins en cofacteurs et corps énergétiques divers, abstraction faite des origines variables des systèmes enzymatiques impliqués dans les réactions.



4. — INHIBITEURS DE LA BIOSYNTHÈSE DES PURINES.

Les précurseurs des purines n'ont pu s'accumuler et être ultérieurement isolés que grâce à l'emploi d'inhibiteurs des différentes étapes des processus enzymatiques leur donnant naissance. Aussi convient-il d'examiner le mode d'action de quelques-uns des plus importants de ceux-ci.

4a. — Azasérine.

L'azasérine, O-diazoacétyle-L-sérine, a été découvert et identifié dans des milieux de culture de *Streptomyces* [67, 84, 85]. Très rapidement la présence de ce nouvel antibiotique fut reliée à la biosynthèse des purines pour diverses

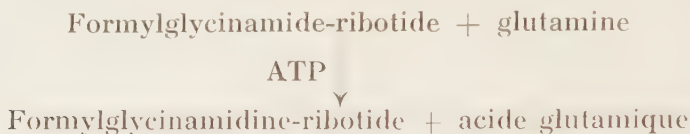
raisons. Son effet inhibiteur sur le développement du sarcome 180 de la souris [280] ainsi que sur la leucémie de la souris [265] a tout d'abord été mis en évidence. Par la suite, on a établi qu'elle empêche l'incorporation du formiate- C^{14} dans les purines des acides nucléiques de la souris [266] et inhibe la synthèse de l'acide inosinique dans des extraits de foie de pigeon [118]. GREENLESS et LE PAGE [113] ont également pu démontrer que l'incorporation de la glycine-2- C^{14} dans les purines des acides nucléiques de certains types de cellules cancéreuses est bloquée par l'azasérine.

Ces dernières années, un grand nombre de travaux a permis de déterminer d'une façon plus précise le mode d'action de ce corps [12, 71, 80, 96, 138, 157, 167, 197, 198, 242, 289] en particulier par l'étude de ses effets sur des cultures bactériennes et de son action inhibitrice sur la formation de l'acide inosinique dans des extraits de foie de pigeon.

Parmi les recherches poursuivies sur l'action de l'azasérine dans des cultures d'*Escherichia coli*, il convient de signaler en premier lieu celles de l'école de SKIPPER [19, 265, 266, 292, 307], mais aussi celles de GOTS et GOLLUP [98] et de KAPLAN et collaborateurs [133]. L'ensemble des résultats obtenus montre que l'azasérine inhibe la formation *de novo* de l'acide inosinique à partir de la glycine, du formiate et de la sérine, tandis que la glutamine, certains acides aminés, les purines et l'AICA, exercent à cet égard un effet plus ou moins antagoniste. Il devient ainsi clair que l'inhibition par l'azasérine précède la formation de l'AICA-ribotide et l'on a également observé que les ribotides de formylglycinamide et de glycinamide s'accumulent dans des cultures d'*Escherichia coli*, inhibées par l'azasérine.

Des essais *in vitro*, avec des extraits de foie de pigeon ont mis en évidence le fait que l'inhibition par l'azasérine provoque aussi l'accumulation des deux mêmes ribotides. Cette inhibition est, en présence d'ATP, empêchée par la glutamine, laquelle agit en entrant en concurrence avec

l'azasérine [42, 43, 45, 118, 161]. Ces résultats ont été confirmés depuis [86, 161, 179] et nous pouvons désormais admettre que l'azasérine empêche la transformation suivante :



4b. — 6-Diazo-5-oxo-L-norleucine.

On a tout récemment [42, 161] découvert un autre antibiotique, le 6-diazo-5-oxo-L-norleucine, exerçant un effet analogue à celui de l'azasérine sur la biosynthèse des purines [179, 230]. Cet autre composé, qui s'est montré encore plus actif que l'azasérine [161] permet également l'accumulation du ribotide de formylglycinamide dans des extraits de foie de pigeon incubés en présence de glycine et de formiate.

4c. — Cyclosérine.

La cyclosérine, D-4-amino-3-isoxazolidone, a été, comme l'azasérine, découverte dans des milieux de cultures de certaines souches de *Streptomyces* [59, 117, 305] et son effet sur *Escherichia coli* B a été étudié par ISHII et SEVAG [128]. Les résultats obtenus indiquent que la cyclosérine inhibe la formation de l'AICA-ribotide, et que cette inhibition a lieu avant même la formation des dérivés de 5-aminoimidazole. Aussi paraît-il fort probable que la cyclosérine exerce un effet comparable à celui de l'azasérine et de la 6-diazo-5-oxo-L-norleucine.

4d. — Sulfamides.

Nous avons déjà mentionné que l'inhibition des cultures bactériennes par les sulfamides a permis l'accumulation

d'AICA comme l'un des intermédiaires dans la biosynthèse des purines. Maintenant qu'a été reconnue l'influence des dérivés de l'acide folique sur la fermeture du noyau pyrimidique des purines (transformylation : AICA-ribotide —→ Acide inosinique) il est plus simple d'expliquer le mécanisme de cette inhibition et l'accumulation de l'AICA-riboside et -ribotide qui en est le résultat.

Dès 1948, WOOD [316], exposant les rapports entre l'acide para-aminobenzoïque (PABA) et ses antimétabolites, les sulfamides, a présenté l'hypothèse que la réaction primitive à laquelle participent ces derniers est une inhibition de la formation de l'acide folique, dont la molécule comporte une unité de PABA. D'après cette hypothèse, et en raison du rôle de cofacteur de l'acide folique dans les réactions transformylantes (exemple : glycinamide-ribotide —→ formylglycinamide-ribotide, et AICA-ribotide —→ acide inosinique), l'AICA-ribotide et -riboside, et, par la suite le glycinamide-ribotide, s'accumulent dans des cultures bactériennes inhibées par les sulfamides [105]. Un grand nombre de recherches ont confirmé cet antagonisme entre les sulfamides d'une part, PABA et acide folique de l'autre [6, 17, 18, 24, 34, 97, 136, 139, 195, 256, 259, 260, 261, 296, 301, 317]. Il est particulièrement intéressant de mentionner les résultats de BERGMANN et coll. [24], qui ont établi que la présence de la méthionine (donateur de formyle) et de quantités catalytiques de PABA dans une culture d'*Escherichia coli*, inhibée par la sulfadiazine, supprime l'accumulation de l'AICA et stimule la croissance du microorganisme, tandis que le PABA seul ou l'acide folique seul n'ont aucun effet. Ces résultats, en accord avec ceux de McDONALD sur le poulet [168] montrent le rôle simultané d'un cofacteur (PABA et acide folique) et d'un donateur de formyle (méthionine) indispensable à la réaction : AICA-ribotide —→ acide inosinique, et par là, à une croissance normale des bactéries.

Il est intéressant de signaler en liaison avec ces faits, l'influence analogue à celle de la méthionine, mais encore

mal expliquée, de la vitamine B₁₂ [4, 5, 6, 7, 17, 23, 24, 69, 97, 123, 194].

4e. — L'acide para-aminosalicylique.

Récemment, plusieurs auteurs ont montré que l'acide para-aminosalicylique, antagoniste de PABA, inhibe la biosynthèse de l'acide folique [123, 136, 137, 138, 295, 296] ; sa présence dans les milieux bactériens permet aussi l'accumulation des dérivés de l'AICA [137] et du glycinamide-ribose [138].

4f. — Antimétabolites de l'acide folique.

Nous disposons actuellement d'une très vaste documentation sur les effets qu'exerce un grand nombre d'antagonistes de l'acide folique — effets que l'on peut rapporter tous à une inhibition de la biogénèse des purines. C'est pourquoi nous nous limitons à citer quelques-uns des travaux les plus complets et les plus récents sur ce sujet [49, 141, 203, 204, 302, 303, 322].

4g. — Antimétabolites des purines.

Parmi le grand nombre d'antimétabolites des purines, il convient de mentionner la 8-azaguanine, dont l'inhibition de l'action sur la croissance de *Diplodia natalensis* [145] et de certaines souches des familles bactériennes *Bacillus* et *Mycobacterium* [23, 173, 174] est antagonisée par l'AICA et par des purines. La 8-azaguanine n'empêche totalement l'incorporation de l'AICA et de phosphate P³² ni dans les acides nucléiques de foie de pigeon et de rat [207, 239], ni dans la souris, *in vivo* [300]. Il serait impossible, dans le cadre de cet exposé, d'examiner séparément l'action de tous les antimétabolites connus des purines. Aussi nous bornerons-nous à attirer l'attention sur quelques travaux récents [11, 20, 39, 55, 94, 125, 192, 200, 207, 233, 235, 288, 322].

5. — CONCLUSION ET RÉSUMÉ. OBJET DE RECHERCHES.

5a. — Biosynthèse des purines, à partir de précurseurs simples.

Il ressort de l'ensemble des résultats que nous venons d'exposer que la biosynthèse des purines réalisée directement à partir de précurseurs simples est aujourd'hui pratiquement élucidée. Grâce à l'emploi de différents inhibiteurs, nous connaissons les intermédiaires se formant au cours de ces processus et par ailleurs, les systèmes enzymatiques responsables des réactions qui y participent et leur mécanisme d'action sont également bien définis.

5b. — Biosynthèse des purines. Participation de molécules plus complexes, en particulier l'histidine.

Il n'en est pas de même en ce qui concerne l'apport de molécules plus complexes à la biosynthèse des purines. En effet, même si la possibilité d'une incorporation complète de ces molécules dans le noyau purique doit être écartée, elles peuvent :

1°) soit servir de donateurs de groupements plus ou moins importants qui s'intègrent directement dans les purines,

2°) soit donner naissance à des intermédiaires, identiques à ceux que nous avons vu se former à partir de précurseurs simples.

Nous avons déjà indiqué l'intérêt particulier que l'on a toujours porté aux rapports existant entre l'histidine et les purines. Pendant longtemps des travaux réalisés avec de l'histidine marquée ont laissé croire que la participation de cet acide aminé à la formation des purines se limitait à une simple donation de « formyle », de

carbone-2 [61, 186, 228, 229, 269, 275]. Ces dernières années, après l'étude détaillée de la dégradation enzymatique de l'histidine en acide glutamique [38, 70, 83, 140, 146, 151, 152, 170, 171, 176, 185, 186, 236, 263, 264, 284, 294, 297, 313] ou en acide formylaspartique (par la voie de l'histamine) [120, 122, 132, 134, 210, 240, 245, 246, 247, 283, 312], plusieurs groupes de chercheurs ont réexaminé le rôle de l'histidine dans la biosynthèse des purines; à cet égard la découverte de l'acide formamidinoglutarique, FAG, comme intermédiaire entre l'acide urocanique et l'acide glutamique, a été d'une importance capitale.

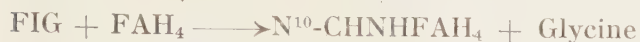
En effet, MILLER et WAELESCH [183, 186] ont montré que l'activité en tant que donateur de « formyle » augmente de l'histidine à l'acide urocanique et atteint son maximum avec l'acide formamidinoglutarique, tandis que les acides formylglutamique et glutamique et la formylglutamine sont, tous les trois, moins efficaces que l'histidine. Des études plus approfondies [184, 286] ont établi par la suite que la donation de « formyle » par l'acide formamidinoglutarique passe par l'intermédiaire de l'acide formimino-tétrahydrofolique, N^{10} -CHNHFAH₄, lequel donne par hydrolyse N^{10} -CHOFAH₄, corps connu comme cofacteur des transformylations. Les réactions sont alors :



Simultanément, RABINOVITZ et ses collaborateurs ont présenté des résultats analogues, obtenus avec l'acide formamidoacétique, FIG, [221, 222, 223], composé que ces mêmes auteurs avaient préalablement isolé au cours de travaux sur la dégradation enzymatique des purines [78, 217, 219, 220, 224, 225]; il devint alors clair que la formation de ce nouveau dérivé de l'acide folique, N^{10} -CHNHFAH₄, accompagne d'une façon générale la dégradation des dérivés formimino ainsi que leur activité de donateurs de « formyle » [187, 218].

En 1956, SAGERS et collaborateurs [243] ont cependant réalisé le transfert intégral du groupement formimino, de

la formiminoglycine, FIG sur la glycine. L'acide formiminotétrahydrofolique ne serait plus alors un simple transporteur de « formyle », mais permettrait un transfert de tout le groupement formimino :



De récents travaux sur la participation des purines à la biosynthèse de l'histidine [9, 169, 172, 191] permettent de penser que de telles réactions de transfert de groupement formimino sont bien plus fréquentes et beaucoup plus importantes biologiquement qu'on ne l'avait pensé auparavant.

Ces résultats ont ouvert de nouvelles perspectives sur une plus forte participation de l'histidine à la formation des purines. Ainsi, la mise en évidence des transferts de groupement formimino offre de nouvelles possibilités d'interprétation pour les expériences de BALIS et LUZZATI [10], lesquels ont montré une utilisation de l'azote du noyau imidazolique de l'histidine pour la biosynthèse des purines. Dans le même ordre d'idées, les travaux de GOTS et LOVE [99] qui ont rapporté que l'histidine est celui des acides aminés (y compris la glycine) qui active le plus la formation de l'AICA dans des cultures proliférantes d'*Escherichia coli*, inhibées par la sulfadiazine, retiennent également l'attention ; il nous paraît difficile en effet d'attribuer la forte activation qu'exerce l'histidine dans ces cas, uniquement à une donation de « formyle » ou à un effet d'épargne d'un précurseur commun, « unité de carbone-2 ».

5c. — Objet de nos recherches.

L'ensemble des questions, encore très mal éclaircies, posées par la participation de l'histidine à la biosynthèse des purines nous a paru mériter une reprise de leur étude.

Nous exposerons, dans les chapitres suivants, les résultats de nos propres recherches, où nous ne nous sommes pas limités à une étude portant sur l'histidine seule, mais où

nous avons également utilisé plusieurs de ses métabolites dans le but de préciser le rôle de chacun des dérivés imidazoliques.

Cherchant à déterminer à quel stade de la biosynthèse des purines se manifeste l'influence de l'histidine et de ses métabolites, nous avons par ailleurs mis en œuvre différents inhibiteurs et quelques intermédiaires connus de la biosynthèse du noyau purique (voir schéma page 28).

Nos recherches ont été poursuivies principalement à l'aide de cultures bactériennes de souches diverses d'*Escherichia coli*, en croissance inhibée, condition qui nous a paru la plus favorable à des recherches sur la biosynthèse totale des purines.

CHAPITRE I.

RECHERCHES PERSONNELLES.

Conditions optima de biosynthèse de la 4(5)-amino-5(4)-imidazolecarboxamide par *Escherichia coli*

SUR LA BIOSYNTHÈSE DES PURINES DANS *ESCHERICHIA COLI*.

Il nous a paru particulièrement favorable d'utiliser des cultures bactériennes traitées par différents inhibiteurs de croissance pour étudier la biosynthèse des purines aux dépens de l'histidine et de ses métabolites. On peut en effet, dans ces conditions, obtenir rapidement et sans trop de difficultés une mesure du degré de l'inhibition de la biosynthèse des purines par celui du ralentissement de la croissance, et dans le cas particulier où l'inhibition est due à une sulfamide, l'intensité de la biosynthèse des purines peut être mesurée par celle des dérivés de l'AICA formé.

Nous avons à choisir entre deux types de cultures bactériennes. Le premier, spécialement utilisé par Gors et LOVE [99] met en œuvre des suspensions de cellules bactériennes non-proliférantes, en phase stationnaire ; le second,

préconisé par GREENBERG [105] utilise des cultures en croissance, comportant donc les « lag »- et « log »-phases (1).

Dans les deux cas, on inhibe les cultures par la sulfadiazine et l'on mesure l'intensité de la biosynthèse des purines par la quantité d'AICA formé.

Chacune des deux méthodes présente ses avantages selon le but poursuivi. Ainsi, la méthode de GORS et LOVE paraît plus favorable à l'étude de l'incorporation des précurseurs directs des purines, car, dans les cultures de cellules non-proliférantes, on se trouve dans des conditions où l'utilisation de ces précurseurs à d'autres fins est réduite au minimum. Par contre, cette méthode ne permettrait guère de recherches précises sur l'incorporation, même partielle, de molécules plus complexes. En effet, une dégradation préalable de celles-ci peut être une condition indispensable à leur participation éventuelle à la biosynthèse des purines. Dans le cas des cellules non-proliférantes et inhibées, dont le métabolisme général est très réduit, cette dégradation est probablement très ralentie ou peut même ne pas avoir lieu. Nous avons déjà vu (page 33) que les dérivés imidazoliques ne semblent pouvoir participer à la formation des purines qu'après avoir subi une telle dégradation préalable ; pour cette raison, les conditions de culture de GORS et LOVE ont paru moins favorables à notre étude sur l'influence de l'histidine et de ses métabolites sur la biogénèse des purines.

La méthode de GREENBERG utilise des cultures en pleine croissance (« lag »- et « log »-phases), donc en pleine activité physiologique. Dans de telles conditions, les produits ajoutés au milieu de culture, précurseurs directs ou molécules plus complexes, peuvent servir à des fins multiples (synthèses protéiques, etc...) mais il est également certain que les cultures en croissance présentent des possibilités physiologiques de dégradation biochimique de l'histidine et de ses métabolites.

(1) « lag »-phase : période où la vitesse de la croissance s'accroît en fonction du temps [40].

« log »-phase : période où la vitesse de la croissance est constante [40].

En outre, dans les conditions adoptées par GREENBERG, avec des bactéries en « lag »- et « log »-phases, nous sommes assurés d'une biosynthèse de purines proportionnellement plus importante qu'avec des cultures non-proliférantes. Pour ces raisons, nous avons — pour notre expérimentation — choisi d'opérer sur des cultures bactériennes en croissance. Nous nous sommes proposés dans celles-ci :

1°) de définir les conditions optima de la biosynthèse des dérivés de l'AICA dans des cultures en croissance d'une souche d'*Escherichia coli* B, (N° 54.125 de la collection de l'Institut Pasteur) ;

2°) de réaliser, par synthèse organique ou par voie biologique, la préparation d'un certain nombre de métabolites de l'histidine et de dérivés de la glycine, susceptibles d'être utilisés au cours d'une étude sur la formation des purines ;

3°) d'étudier le mode d'action de l'histidine et de ses métabolites sur la biosynthèse des dérivés de l'AICA et par là sur la biosynthèse des purines.

I. — Conditions optima générales de biosynthèse de l'AICA et de ses dérivés, dans des cultures en croissance d'*Escherichia coli* B, 54.125.

Depuis la découverte de l'AICA et la confirmation de sa fonction d'intermédiaire dans la formation de l'acide inosinique, un très grand nombre de travaux sur les conditions définissant son accumulation et son isolement à partir de milieux bactériens ont été réalisés. C'est ainsi que les rapports entre l'AICA et de nombreux glucides ont été établis [99, 256, 278, 279] et que l'influence exercée par certains acides aminés sur la formation de l'AICA a été récemment décrite [6, 94, 99, 227]. Les rapports entre de nombreux donateurs de « formyle » et l'AICA [17, 18, 23, 24, 92, 97, 165], entre les purines et l'AICA [6, 17, 94, 95] ont également fait l'objet de nombreuses recherches. GOTS [92] a signalé que l'optimum de formation de l'AICA en fonction de la concentration de sulfamides se manifeste au moment où

les cultures bactériennes sont inhibées à 50-60 %. L'accumulation d'AICA sous forme de riboside et de ribotide a été mise en évidence [16, 93, 103, 105] et GREENBERG [105, 112] a déterminé, avec une souche d'*Escherichia coli* B, les meilleures conditions d'accumulation de l'AICA et les méthodes d'isolement de son riboside. Il ressort cependant de ces travaux qu'il est extrêmement difficile de généraliser les premières, même pour des souches appartenant à la même famille bactérienne, et c'est pourquoi il nous a paru tout d'abord nécessaire et important d'élaborer en détail les conditions qui, avec notre souche, permettraient d'accumuler les plus grandes quantités d'AICA par millilitre de milieu de culture.

Méthodes.

a) MILIEU DE CULTURE.

Au cours de toute notre expérimentation, nous avons employé le milieu de SPIZIZEN [273], milieu de culture synthétique composé de sels minéraux et de glucose, élaboré spécialement pour les souches d'*Escherichia coli* B. Sa composition est la suivante :

NH ₄ Cl	0,05	%
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,005	%
NaCl	0,01	%
MgCl ₂ , 6H ₂ O	0,01	%
Na ₂ HPO ₄ , anhyd.	0,6	“
KH ₂ PO ₄	0,3	“
Glucose	0,4	“

Chaque culture a été précédée d'une adaptation des bactéries au milieu synthétique. Après 16 heures d'adaptation, nous avons contrôlé la densité bactérienne dans la culture et éventuellement ajusté avec de l'eau physiologique stérile de telle façon que 0,5 ml. de cette suspension bactérienne (l'inoculat) pipeté stérilement dans le milieu de culture de l'expérience (10 ml.), nous donne une densité bactérienne au départ égale à 3-5 unités de mesure (Klett-Summerson, filtre N° 64).

b) DOSAGE DE L'AICA.

Les dosages d'amine diazotable, mais non acétylable, ont été effectués d'après la méthode de BRATTON et MARSHALL [37], modifiée par RAVEL et collaborateurs [227]. Nos mesures ont été faites à 540 m μ au spectrophotomètre de Beckmann avec l'AICA synthétique comme étalon. Nous avons observé que la coloration est sensible à la lumière ultraviolette et que les essais doivent être effectués à l'abri de la lumière solaire directe (diminution de 80-85 % de la coloration après 30 minutes au soleil).

c) MESURE DE LA CROISSANCE BACTÉRIENNE.

Nous avons mesuré la croissance de notre microorganisme par l'évolution de la densité bactérienne, cette dernière étant suivie par des mesures de la suspension bactérienne de notre culture au spectrophotomètre Klett-Summerson, avec le filtre N° 64.

d) CHROMATOGRAPHIE.

La séparation chromatographique de l'AICA et de ses dérivés a été opérée sur papier Whatman N° 1, lavé à l'acide acétique 2 N, en employant comme solvants : n-butanol, saturé d'eau, et des mélanges : propanol-eau (4 : 1), et n-butanol-diéthylèneglycol-eau (4 : 4 : 1). Les chromatogrammes descendants ont été examinés en lumière de Wood et révélés, soit par l'application des réactifs de BRATTON et MARSHALL [37], soit par pulvérisation de parachloroaniline diazotée, suivant la technique de BLOCK et collaborateurs [33]. La méthode de BRATTON et MARSHALL révèle l'ensemble des composés contenant de l'AICA, tandis que celle de BLOCK et coll. ne décèle que l'AICA libre. Pour détecter les ribotides éventuels dans nos milieux de culture, nous avons appliqué la méthode de HANES et ISHERWOOD [116] qui consiste en une vaporisation d'un mélange perchloromolybdique, suivie d'un séchage à l'air, chauffage à 80-90° C. pendant 3-5 minutes et une révélation, soit dans un milieu réducteur (bocal saturé d'hydrogène sulfuré), soit

par une exposition de la bande aux rayons ultraviolets. Les esters phosphoriques se détachent en bleu sur fond blanc.

**I-A : Biosynthèse de l'AICA et de ses dérivés
en fonction des conditions de culture.**

A-1. — CONDITIONS D'AÉROBIOSE.

GREENBERG signale 105 que les quantités d'inoculat et le degré d'aérobiose sont importants pour l'accumulation d'AICA. Nous avons déterminé les conditions optima d'aérobiose pour notre souche d'*Escherichia coli* B. 54.125 ; pour ce faire nous avons adopté comme inhibiteur la sulfadiazine à des concentrations voisines de celles choisies par GREENBERG et utilisé une quantité d'inoculat égale au 1/20^e de la quantité finale du milieu de culture. Nous avons exprimé le degré d'aérobiose par le rapport de la surface du milieu à sa profondeur. Le tableau I résume nos résultats.

TABLEAU I.

Type de culture		Rapport surface profondeur	AICA accumulé (1)
Milieu (en ml)	Récipients standard utilisés		
125	ballon Pasteur (1 litre)	177	1-5
200	id. (1 litre)	118	1-5
100	Erlenmeyer (500 ml)	44	50
15	id. (150 ml)	42	80
20	id. (150 ml)	40	80
50	id. (250 ml)	38	70
10	id. (100 ml)	35	100
10	id. (50 ml)	10	70
10	tube à essai ordinaires	0,2	1-5

(1) La concentration d'AICA dans les différentes cultures est exprimée en pour cent de l'accumulation obtenue dans des cultures de 10 ml effectuées dans les Erlenmeyers de 100 ml.

Ceux-ci montrent que l'on observe la formation maxima d'AICA dans une culture effectuée à raison de 10 ml. de milieu pour une fiole d'Erlenmeyer de 100 ml. Le meilleur rendement en AICA est obtenu lorsque les cultures ne sont pas agitées.

Ainsi nos résultats sont en accord avec ceux de GREENBERG [105] et de SEVAG et STEWART [256], tandis que GOTS et LOVE [99] indiquent une aérobiose totale comme la plus favorable à une accumulation d'AICA dans des cultures non proliférantes.

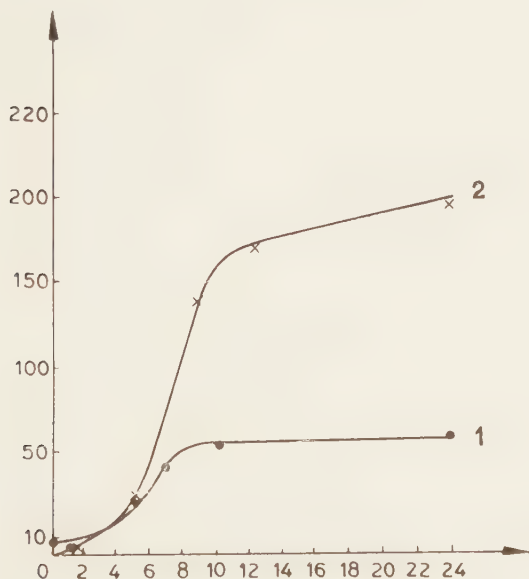


FIG. 1.

Diagrammes de croissance d'*Escherichia coli* B, 54.125 inoculé dans un milieu synthétique [273], contenant de la sulfadiazine (conc. $0,45 \times 10^{-4}$ M).

Courbe 1 : Densité bactérienne.

Courbe 2 : Formation d'AICA.

Abscisses : Temps de culture, en heures.

Ordonnées : Pour la courbe 1 : Mesures au spectrophotomètre Klett-Summerson.

Pour la courbe 2 : Dosages d'après Bratton-Marshall.

A-2. — FORMATION D'AICA EN FONCTION DE LA DURÉE DE CULTURE.

Afin d'étudier la biosynthèse des purines dans notre souche d'*Escherichia coli*, exclusivement dans les « lag »- et « log »-phases, nous avons été amenés à établir les diagrammes de croissance bactérienne et de formation d'AICA.

Dans les conditions d'aérobiose et d'inhibition que nous venons de décrire, nous avons premièrement effectué des cultures où nous avons procédé à des prélèvements de fioles (moyenne de 5-10 fioles) en fonction du temps (en heures). Les diagrammes, fig. 1, montrent nos résultats avec de telles cultures et l'on observe que la formation d'AICA (courbe 2, fig. 1) s'arrête au moment où la densité bactérienne (courbe 1, fig. 1) devient stationnaire (après 10-12 heures).

En conséquence, avons-nous adopté au cours de notre expérimentation des durées de cultures voisines de 10-12 heures.

A-3. — FORMATION D'AICA EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN SULFADIAZINE.

Dans les conditions optima d'aérobiose et de durée de culture que nous venons de décrire, nous avons étudié la résistance de notre souche bactérienne à la sulfadiazine, pour déterminer la concentration de cet inhibiteur qui permettrait une accumulation maxima d'AICA dans le milieu.

Comme le montrent les diagrammes, fig. 2, nous obtenons un maximum de formation d'AICA à une concentration de sulfadiazine, $0,5 \times 10^{-4}$ M., sensiblement la même que celle indiquée par GREENBERG ($0,45 \times 10^{-4}$ M.). GOTS [92] signale que l'optima d'accumulation d'AICA s'observe quand les bactéries sont inhibées à 50-60 %, tandis que nos essais avec *Escherichia coli* B, 54.125 indiquent l'inhibition de 65 % comme la plus favorable.

Dans la suite de notre expérimentation nous avons, sauf indication contraire, utilisé une concentration en sulfadia-

zine égale à $0,5 \times 10^{-4}$ M., entraînant une inhibition des cultures de 65 %.

A-4. — FORMATION D'AICA EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN GLYCINE.

RAVEL et collaborateurs [227] signalent que l'accumulation d'AICA par des bactéries est fonction de la concentration en glycine dans le milieu, et GREENBERG [103] indique la concentration de 4×10^{-4} M. de cet acide aminé comme la plus favorable.

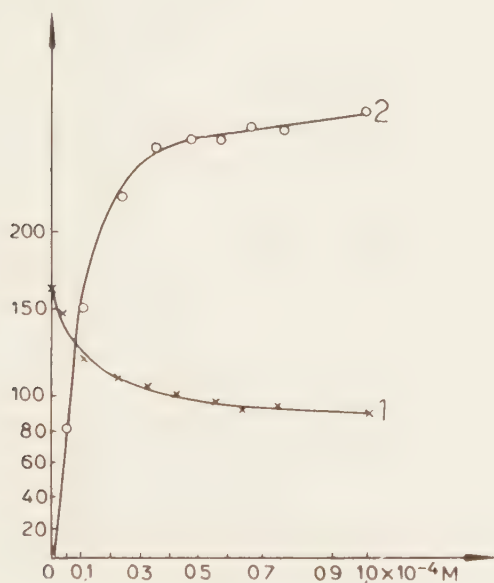


FIG. 2.

Formation d'AICA dans des cultures d'*Escherichia coli* B, 54.125, inoculé dans un milieu synthétique [273] contenant de la sulfadiazine en concentrations croissantes (0 à $1,0 \times 10^{-4}$ M). Temps de culture : 11 heures.

Courbe 1 : Densité bactérienne.

Courbe 2 : Formation d'AICA.

Abscisses : Concentrations de sulfadiazine.

Ordonnées : Pour la courbe 1 : Mesures au spectrophotomètre Klett-Summerson.

Pour la courbe 2 : Dosages d'après Bratton-Marshall.

Aussi avons-nous étudié le rapport entre la concentration en glycine, ajoutée au milieu, et la quantité d'AICA formée après 11 heures de culture et dans les conditions d'inhibition et aérobiose que nous venons de déterminer.

Comme l'expriment les courbes, fig. 3, nous observons un maximum d'accumulation d'AICA pour une concentration de glycine voisine de $0,75 \times 10^{-3}$ M. Notre souche bactérienne exige donc des quantités de glycine beaucoup plus élevées que celles indiquées par d'autres auteurs [103, 227].

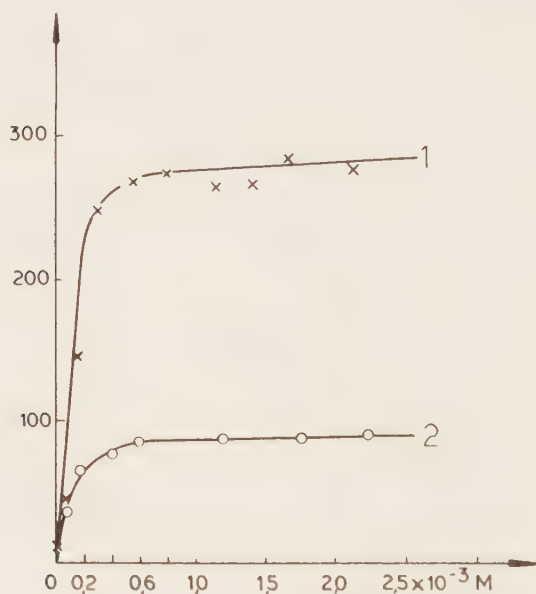


FIG. 3.

Formation d'AICA dans des cultures d'*Escherichia coli* B, 54.125, inoculé dans un milieu synthétique [273] contenant de la sulfadiazine ($0,5 \times 10^{-4}$ M.) et de la glycine en concentrations croissantes (0 à $2,5 \times 10^{-3}$ M.).

Temps de culture : 11 heures.

Courbe 1 : Formation d'AICA.

Courbe 2 : Densité bactérienne.

Abscisses : Concentrations de glycine.

Ordonnées : Pour la courbe 1 : Dosages d'après Bratton-Marshall.
Pour la courbe 2 : Mesures au spectrophotomètre Klett-Summerson.

A-5 : FORMATION D'AICA EN FONCTION
DE LA CONCENTRATION DU GLUCOSE.

L'importance de la concentration en glucose du milieu pour une accumulation optima d'AICA a été signalée et étudiée par plusieurs auteurs [93, 99, 103, 105, 256, 277, 278, 279]. En général, on a utilisé le glucose à des taux de 0,2 à 0,4 %.

Les courbes suivantes, fig. 4, résument notre expérimentation à ce sujet et montrent qu'avec notre microorganisme et dans les conditions d'inhibition et d'aérobiose optima,

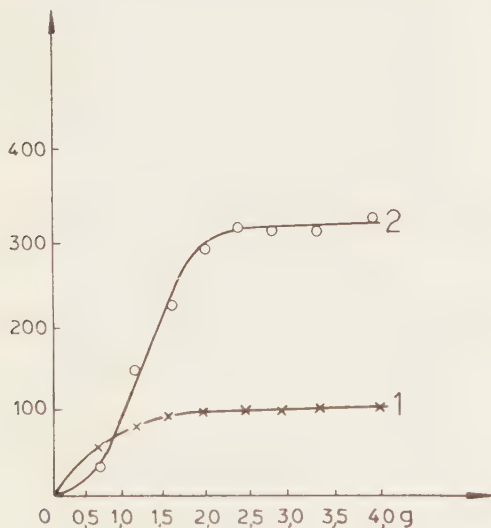


FIG. 4.

Formation d'AICA dans des cultures d'*Escherichia coli* B, 54.125, inoculé dans un milieu synthétique [273] contenant de la sulfadiazine ($0,5 \times 10^{-4}$ M.) et du glucose en concentrations croissantes (0 à 0,4 %).

Temps de culture : 11 heures.

Courbe 1 : Densité bactérienne.

Courbe 2 : Formation d'AICA.

Abscisses : Concentrations en glucose, en grammes par litre de milieu.

Ordonnées : Pour la courbe 1 : Mesures au spectrophotomètre Klett-Summerson.

Pour la courbe 2 : Dosages d'après Bratton-Marshall.

nous obtenons le maximum de formation d'AICA dans un milieu contenant au moins 0,25 % de glucose.

I-A : Conclusions.

En conclusion de nos expériences sur l'optima de formation d'AICA en fonction de l'aérobiose, de la durée de culture, et des concentrations des suppléments essentiels à cette biosynthèse (sulfadiazine, glycine et glucose), nous constatons que l'accumulation maxima de l'AICA dans notre souche d'*Escherichia coli* B, 54.125 s'effectue dans les conditions générales suivantes :

Aérobiose : 10 ml. de milieu dans une fiole d'Erlenmeyer de 100 ml.

Durée de culture : 11 heures.

Concentration en sulfadiazine : $0,5 \times 10^{-4}$ M.

Concentration en glycine : $0,75 \times 10^{-3}$ M.

Concentration en glucose : 0,25 %.

I-B : Identification des dérivés de l'AICA accumulés dans le milieu de culture.

B-1 : ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE.

Dans les conditions de culture que nous venons de décrire, nous avons cherché à isoler, purifier et identifier les dérivés de l'AICA qui s'accumulent dans le milieu. Déjà, en 1954, GREENBERG [107, 112] signale que dans des cultures d'*Escherichia coli*, inhibées, on trouve préférentiellement l'AICA sous forme de riboside, tandis que les quantités du riboside correspondant et celles de la base libre sont faibles.

Nous avons réalisé l'analyse chromatographique du milieu bactérien après 11 heures de culture dans des conditions optima. Le chromatogramme, fig. 5, illustre nos résultats et montre que le dérivé d'AICA accumulé est différent de l'AICA libre.

B-2 : TECHNIQUE D'ISOLEMENT.

Nous avons donc procédé à l'isolement et à la purification du dérivé de l'AICA, en modifiant le procédé indiqué par GREENBERG [107, 112]. Nous avons utilisé du charbon actif animal (Acticarbone S) préalablement activé et lavé pendant 30 minutes par suspension dans un mélange

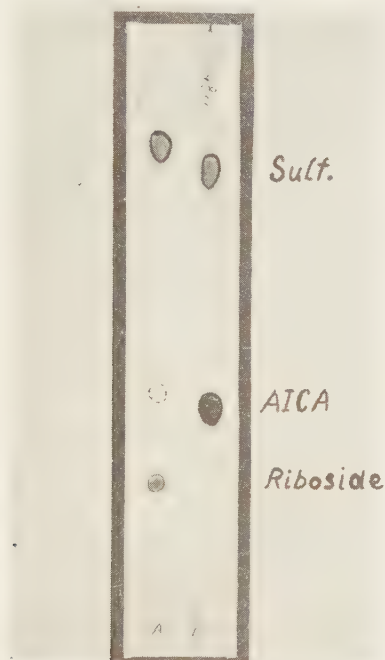


FIG. 5.

Analyse chromatographique du milieu de culture d'*Escherichia coli* B, 54.125, après 11 heures de croissance inhibée par la sulfadiazine. Le chromatogramme illustre que le dérivé de l'AICA formé est différent de l'AICA libre.

A : Milieu optimum, après 11 heures de culture.

B : Milieu optimum, non incubé mais supplémenté en AICA synthétique.

Papier : Whatman N° 1, lavé à CH_3COOH , 2 N.

Solvant : n-butanol, saturé d'eau.

Révélation : D'après Bratton-Marshall.

Chromatographie descendante.

bouillant d'alcool éthylique à 95 % et de NH_4OH , 2 N (1 : 1). Le charbon est ensuite filtré, séché à 120° et tamisé.

1,25 g. de charbon, préalablement activé et lavé, assure une absorption complète des dérivés de l'AICA dans 100 ml. du milieu de culture. On laisse le charbon en suspension dans le milieu contenant l'AICA pendant 30 minutes, à froid, avant filtration. On lave ensuite le charbon sur filtre, à raison de 20 ml. d'eau distillée par gramme de charbon, pour éliminer la plus grande partie des glucides et d'autres corps. L'eau de lavage donne une réaction négative avec les réactifs de BRATTON-MARSHALL [37].

L'élution des dérivés de l'AICA fixés au charbon est réalisée avec un mélange d'alcool éthylique à 65 % et de NH_4OH , 0,02 N (160 : 70). 50 ml. de ce mélange par gramme de charbon permettent une élution presque totale (80 %).

La solution alcoolo-ammoniacale des dérivés de l'AICA est ensuite évaporée à sec, sous vide, et à une température inférieure à 45° C. — reprise par l'eau distillée, ajustée à $\text{pH} = 6,5 - 7,0$ et conservée au froid.

B-3 : PURIFICATION SUR ÉCHANGEUR D'IONS.

L'éluat du charbon actif contient, en dehors des dérivés de l'AICA et de la sulfadiazine, quelques impuretés (sucres, etc...). Nous l'avons purifié sur une colonne de Dowex 50×8 , 20-50 mesh, amené sous sa forme H^+ par traitement à HCl , 2 N, lavé à pH neutre avec de l'eau fraîchement bouillie.

L'éluat du charbon actif est porté à pH 3-4 immédiatement avant mise sur colonne et, après que cette dernière ait été lavée avec de l'eau bouillie, on peut éluer le dérivé de l'AICA fixé avec NH_4COOH , 2 N.

Le diagramme, fig. 6, illustre un exemple caractéristique de cette purification et montre qu'un dérivé d'AICA est élué de la colonne, concentré en un seul pic (entre 2.600 et 3.700 ml. d'éluat). Les fractions recueillies entre 0 et 1650 ml. sont le produit d'un lavage à l'eau, après lequel on

commence l'élution avec une solution de formiate d'ammonium, 2 N.

Les dosages d'AICA, effectués sur les fractions des premiers 100 ml. d'éluat à l'eau, ne doivent pas être retenus, car ces fractions — de 10 ml. chacune — sont très colorées en elles-mêmes (jaunes).

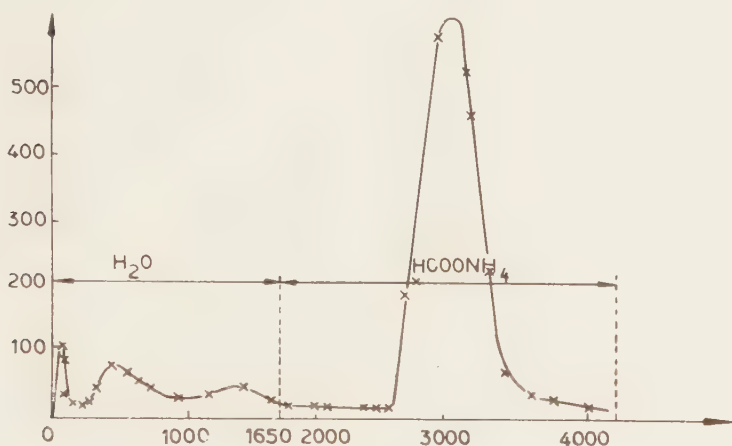


FIG. 6.

Purification et isolement sur colonne de Dowex 50 $\times$ 8, 20-50 mesh, forme H', du dérivé d'AICA formé dans le milieu de culture d'*Escherichia coli* B, 54.125. La séparation sur la colonne a été effectuée à l'aide d'un collecteur de fractions automatique — à raison de 10 ml. par fraction. Après la mise sur colonne de la solution, contenant les dérivés d'AICA, nous avons d'abord lavé la colonne avec de l'eau fraîchement bouillie (0 — 1650 ml. d'éluat) et ensuite avec de NH₄OOCH, 2N.

Abscisses : ml. d'éluat.

Ordonnées : Dosages d'AICA, d'après Bratton-Marshall.

Le pic qu'on observe entre 300 et 600 ml. d'éluat à l'eau semble dû à un dérivé de l'AICA qui ne se fixe pas sur la colonne, — qui n'est pas ionisé à pH = 8,1. Il est donc exclu d'avance que le dérivé d'AICA correspondant puisse être le riboside de l'AICA ou la base libre. Par contre, il paraît probable que ce dérivé d'AICA soit le ribotide correspondant, mais sa caractérisation directe est rendue très incertaine par les impuretés (sels minéraux et sucres) qui se trouvent encore dans ces fractions.

B-4 : IDENTIFICATION DU DÉRIVÉ DE L'AICA.

En vue de l'analyse chromatographique nous avons recueilli la partie de l'éluat de la colonne comprise entre 2.600 et 3.700 ml. (fig. 6) qui est ajustée à pH 7,0 et lyophilisée. Le résidu repris par l'eau distillée est chromatographié dans nos solvants habituels. Quel que soit celui utilisé, nous observons une seule tache, identique à celle obtenue en chromatographiant le milieu de culture immédiatement après l'arrêt de la croissance (fig. 7). Aussi avons-nous la certitude que le dérivé d'AICA accumulé ne se transforme pas au cours des opérations de purification et d'isolement.

Afin d'identifier le dérivé de l'AICA ainsi purifié, nous avons procédé à une hydrolyse acide, à pH = 1, 30 minutes à 100° C. La chromatographie avant et après hydrolyse montre que le dérivé d'AICA se décompose en AICA libre, en donnant naissance simultanément à du ribose, identifié soit par chromatographie [126] soit par réaction en solution [63]. Le dérivé de l'AICA ne contient pas de phosphate organique (essais négatifs par les réactifs de HANES et ISHERWOOD [116]).

Par ailleurs, ce composé d'AICA possède — après chromatographie dans un solvant identique à celui de GREENBERG [103] — une valeur de Rf très voisine de celle que cet auteur attribue au riboside de l'AICA. Aussi pouvons-nous le considérer comme celui-ci.

I-C : Formation d'AICA-riboside en fonction de la concentration en D-ribose.

Après l'identification du dérivé de l'AICA accumulé dans le milieu de culture comme l'AICA-riboside, il nous a paru intéressant d'étudier si un supplément de ce pentose dans le milieu bactérien permet d'augmenter les quantités d'amine diazotable, mais non acétylable, qui s'accumulent dans les cultures.

Nous avons déjà mentionné des travaux antérieurs [99, 256, 278, 279] qui ont eu pour objet l'étude des rapports

entre les glucides et la formation d'AICA. Ainsi, STEWART et SEVAG [278] mentionnent que le pentose, L-arabinose, active la biosynthèse d'AICA plus encore que le glucose et que l'association du L-arabinose avec le pyruvate permet



FIG. 7.

Chromatogramme démontrant que le dérivé de l'AICA formé au cours de la croissance inhibée d'*Escherichia coli* B, 54.125, reste inchangé pendant les opérations de purification et que ce dérivé est bien différent de l'AICA libre.

1. AICA synthétique.
2. Eluat du charbon actif, hydrolysé, supplémenté en AICA synth.
3. Eluat du charbon actif, hydrolysé.
4. Eluat du charbon actif.
5. Eluat de la colonne de Dowex 50, entre 2.600 et 3.700 ml.
6. Eluat de la colonne de Dowex 50, supplémenté en AICA synth.
7. Eluat de la colonne de Dowex, plus l'éluat du charbon actif.

Papier : Whatman N° 1, lavé à CH_3COOH , 2 N.

Solvant : n-Propanol — eau (4 : 1).

Révélation : D'après Bratton-Marshall.

Chromatographie descendante.

une biosynthèse optima dans des cultures d'*Escherichia coli* en croissance.

Les expériences de Gots et Love [99] avec des cellules non proliférantes indiquent cependant que ni le D-arabinose, ni le D-ribose, ni le L-xylose ne peuvent remplacer le glucose pour la biosynthèse d'AICA. Le L-arabinose ne donne qu'un résultat bien inférieur à celui que ces auteurs observent avec le glucose seul.

En admettant que les possibilités d'utilisation des pentoses puissent varier d'une souche bactérienne à une autre et après avoir constaté que l'AICA s'accumule dans notre souche préférentiellement sous forme de riboside, il nous a paru intéressant d'étudier l'influence que pourrait exercer un supplément de D-ribose sur la biosynthèse d'AICA.

Dans des conditions optima de formation d'AICA, décrites dans ce chapitre I-A, un supplément de D-ribose (10^{-3} M) dans le milieu de culture semble inhiber à la fois la croissance des bactéries et la formation du dérivé de l'AICA (voir tableau II, expériences 1 et 2). Par contre, en opérant dans des conditions suboptima au point de vue de la concentration en glycine, la présence de D-ribose dans le milieu permet de doubler le rendement en AICA-riboside (tableau II, exp. N° 3 et 4) tout en augmentant simultanément d'un tiers la densité bactérienne. Dans ce dernier cas,

TABLEAU II.

N° de l'expérience	D-ribose	Sulfadiazine	Glycine	AICA total dans 10 ml après 44 h.
1	—	$0,45 \cdot 10^{-4}$ M	$1,2 \cdot 10^{-3}$ M	1,3 μ M
2	10^{-3} M	$0,45 \cdot 10^{-4}$ M	$1,2 \cdot 10^{-3}$ M	0,5 μ M
3	—	$0,45 \cdot 10^{-4}$ M	$0,4 \cdot 10^{-3}$ M	0,4-0,5 μ M
4	10^{-3} M	$0,45 \cdot 10^{-4}$ M	$0,4 \cdot 10^{-3}$ M	0,9-1,10 μ M
5	—	$1,4 \cdot 10^{-4}$ M	$0,4 \cdot 10^{-3}$ M	0,8 μ M
6	10^{-3} M	$1,4 \cdot 10^{-4}$ M	$0,4 \cdot 10^{-3}$ M	0,8 μ M
7	10^{-3} M	$1,4 \cdot 10^{-4}$ M	$0,8 \cdot 10^{-3}$ M	1,8 μ M

nous avons essayé d'augmenter le taux de la sulfadiazine pour maintenir les cultures à une inhibition égale à 65 %, définie comme optimale, mais le supplément de ribose est alors resté sans effet (tableau II, exp. N° 5 et 6).

L'accumulation la plus forte a été obtenue dans les conditions indiquées par l'expérience N° 7, tableau II — conditions identiques à celles décrites chap. I-A, mais avec un taux de sulfadiazine plus élevé — $1,4 \times 10^{-4}$ M. au lieu de $0,5 \times 10^{-4}$ M. — et en présence de D-ribose (conc. 10^{-3} M.).

I-D : Formation de l'AICA-ribotide.

Nous avons dans le chapitre I-B, identifié le dérivé d'AICA qui s'accumule dans notre souche bactérienne au N-riboside de l'AICA. Par contre, nous ne trouvons dans le milieu de culture que des traces du ribotide correspondant, — bien que nous possédions à l'heure actuelle une importante documentation en faveur du schéma de biosynthèse des purines comportant une formation de l'AICA-ribotide préalable à celle de l'AICA-riboside. GREENBERG, qui est arrivé à un résultat semblable au nôtre (sic. accumulation de l'AICA-riboside) [103], tente d'expliquer ce fait par une hydrolyse enzymatique très rapide et presque totale du ribotide formé par les bactéries, processus qui conduirait à la formation du riboside. Ce même auteur [104, 108] a ultérieurement — à partir de l'AICA-riboside — réalisé la synthèse biologique de l'AICA-ribotide *in vitro* avec un extrait dialysé de foie de pigeon et un autolysat de levure en présence de l'ATP, de l'acide phosphoglycérique et d'ions Mg^{++} , tandis que FLAKS, ERWIN et BUCHANAN [74] ont pu réaliser la synthèse enzymatique de l'AICA-ribotide à partir de l'AICA libre avec un extrait de foie de bœuf. Avec des bactéries *in vivo* aucun résultat positif n'a été obtenu à notre connaissance.

En admettant l'hypothèse de GREENBERG [103] comme exacte nous avons essayé d'inverser cette hydrolyse en ajoutant un excès d'AICA libre dans notre milieu de culture. Nous observons alors tout d'abord, après un temps de

culture de 10-12 heures, qu'aucun changement ne se manifeste — sauf la formation *de novo*, attendue, du riboside de l'AICA.

Par contre, en laissant les bactéries se développer dans le milieu à 37°C pendant 36 heures, nous observons la formation d'un nouveau dérivé d'AICA, dont les propriétés



FIG. 8.

Chromatographie mettant en évidence l'AICA comme constituant de l'AICA-ribotide et du corps inconnu, X_2 .

T : AICA synthétique.

1 : Corps inconnu, X_2 .

2 : Corps inconnu, X_2 , après hydrolyse à pH = 1, 30 minutes, 100°C.

3 : AICA-ribotide.

4 : AICA-ribotide, après hydrolyse à pH = 1, 30 minutes, 100°C.

Papier : Whatman N° 1, lavé à CH_3COOH , 2 N.

Solvant : n-Propanol — eau (4 : 1).

Révélation : Selon Bratton-Marshall.

Chromatographie descendante.

(spectre UV, Rf dans plusieurs solvants, fluorescence, révélations BRATTON-MARSHALL, BLOCK, HANES et ISHERWOOD) indiquent qu'il s'agit du ribotide de ce corps. Ce composé donne, en outre, naissance à l'AICA par hydrolyse acide



FIG. 9.

Chromatogrammes montrant la formation des deux artéfacts, X_1 et X_2 et le ribotide de l'AICA.

1. Milieu contenant l'AICA synthétique, avant inoculation.
2. Comme 1, après 36 heures de culture.
3. Milieu contenant la sulfadiazine et l'AICA synth., avant inoculation.
4. Comme 3, après 36 heures de culture.
5. Milieu contenant la sulfadiazine, le ribose et l'AICA-synth., avant inoculation.
6. Comme 5, après 36 heures de culture.
7. Milieu contenant le ribose et l'AICA-synth., avant inoculation.
8. Comme 7, après 36 heures de culture.

Chromatogramme A : Papier : Whatman N° 1, non lavé.
Solvant : n-Propanol — eau (4 : 1).
Révélation : Selon Bratton-Marshall.
Chromatographie descendante.

Chromatographie B : Papier : Whatman N° 1, non lavé.
Solvant : n-Butanol, saturé d'eau.
Révélation : Selon Bratton-Marshall.
Chromatographie descendante.

(pH = 1, 100°C, 30 minutes) ainsi que le montre le chromatogramme, fig. 8.

La plus forte accumulation en AICA-ribotide se produit après 36 heures de culture dans le milieu habituel, additionné d'AICA (10^{-3} M.) et de sulfadiazine ($1,4 \times 10^{-4}$ M.), et notre expérimentation montre que la formation du ribotide est activée par la présence du D-ribose (10^{-3} M.). Le ribotide se forme même dans le cas où le milieu ne contient pas d'inhibiteur mais du ribose, tandis qu'il n'en est pas de même en l'absence de sulfadiazine avec le glucose comme seule source glucidique. Ceci semble indiquer que la formation du ribotide n'est pas une synthèse de *novo* mais qu'elle s'effectue aux dépens de l'AICA ajouté au milieu et qu'il s'agit alors d'une inversion de l'équilibre d'hydrolyse (fig. 9, A et B).

Il convient de signaler ici la formation de deux composés contenant de l'AICA, X_1 et X_2 , qui se forment tous les deux au cours de la stérilisation du milieu supplémenté en AICA quand la température devient trop élevée (120-125°C.). Nous n'avons pas cherché à identifier ces deux artéfacts mais il est intéressant de signaler que le corps X_2 est métabolisé par un extrait de foie de pigeon sans donner lieu à une formation simultanée d'AICA libre.

I. — Conditions optima de biosynthèse de l'AICA
et de ses dérivés,
dans des cultures d'*Escherichia coli* B, 54.125,
inhibées par la sulfadiazine.

Résumé et Conclusions.

Les recherches que nous venons d'exposer ont permis de définir les conditions optima de formation des dérivés d'AICA avec le ribose et le ribose-phosphate.

Pour le premier composé, l'AICA-riboside, nous trouvons que ces conditions sont remplies dans un milieu complexe, supplémenté en glycine, glucose et sulfadiazine. La plus grande accumulation en AICA-riboside s'effectue cepen-

dant quand la croissance de notre souche bactérienne a lieu en présence également du D-ribose. Le rendement en dérivé d'AICA est alors supérieur à celui obtenu par d'autres auteurs (1,3 $\mu\text{M}/\text{ml}$ contre 0,8 $\mu\text{M}/\text{ml}$ pour GREENBERG [105 112]).

Cette accumulation importante en AICA-riboside nous a amené à élaborer une technique d'isolement et de purification du riboside. GREENBERG [107, 112] avait déjà donné des indications sur une telle méthode, mais nous l'avons étudiée systématiquement et par absorption sur charbon actif, suivie d'une séparation sur colonne de Dowex 50, nous avons obtenu l'AICA-riboside à l'état chromatographiquement pur et donnant un spectre ultra-violet identique à celui du corps pur [105].

L'AICA-ribotide ne constituant qu'un très faible pourcentage de l'AICA, formé au cours d'une croissance inhibée d'une durée de 10-12 heures, nous n'avons pas pu le mettre en évidence par chromatographie directe du milieu d'incubation. Pourtant, comme l'indique le diagramme de séparation sur colonne de Dowex 50 (fig. 6) la faible quantité de dérivé d'AICA, représentée par l'éluat recueilli entre 300 et 600 ml pourrait être due au ribotide correspondant. Les essais de caractérisation de ce corps n'ont cependant pas donné de résultats concluants en raison de la présence d'impuretés.

C'est pourquoi nous avons essayé de réaliser la synthèse biologique du ribotide d'AICA à partir d'AICA libre. Notre expérimentation montre que l'inversion de la réaction d'hydrolyse : AICA-ribotide $\longrightarrow$ AICA + ribose + phosphate, peut avoir lieu dans des conditions bien différentes de celles qui avaient permis la formation *de novo* du riboside. Dans des cultures maintenues pendant 36 heures à 37°C et dont le milieu a été supplémenté en AICA libre et en D-ribose, nous avons mis en évidence — par chromatographie — une formation importante d'AICA-ribotide, tandis que le taux du riboside est alors très faible.

Après avoir défini les conditions optima de formation des dérivés d'AICA par *Escherichia coli* B, 54.125, nous avons abordé l'étude de l'influence de l'histidine et de ses métabolites sur la biosynthèse de ces mêmes dérivés et par là sur celle des purines.

Pour ce faire, il était indispensable de disposer d'un certain nombre d'intermédiaires dans la dégradation de l'histidine et dans la biosynthèse des purines. Aussi, avons-nous d'abord mis au point les synthèses organiques ou biologiques de quelques-uns de ces composés. Nous exposerons les résultats de ce travail dans le chapitre suivant.

CHAPITRE II.

Synthèses de dérivés de l'histidine et de la glycine

Afin d'étudier

1°) l'activation que pourraient exercer l'histidine et ses métabolites dans la biosynthèse des purines, et

2°) le mécanisme d'une telle activation,

il nous a paru nécessaire de pouvoir disposer d'un certain nombre d'intermédiaires possibles de ces réactions.

Nous avons déjà dans l'introduction (page 34) mentionné que les découvertes récentes sur la dégradation enzymatique de l'histidine ont permis l'identification des acides formamidinoglutarique et formylglutamique comme intermédiaires dans les réactions de dégradation de l'histidine en acide glutamique. D'autre part, l'histidine peut être dégradée en acides imidazolepyruvique et imidazoleacétique, processus qui conduit ensuite à la formation des acides formiminoaspartique, formylaspartique et aspartique.

Nous exposerons ci-dessous la préparation d'un certain nombre de ces intermédiaires :

A) métabolites de l'histidine,

B) dérivés de la glycine,

susceptibles d'intervenir dans la biosynthèse des purines.

II-A) Synthèse des métabolites de l'histidine.

II-A 1. — Acide formamidinoglutarique, FAG.

La préparation de l'acide formamidinoglutarique (point de fusion non-corrigé : 80-87°C) a été réalisée aussi bien par synthèse organique [182, 255] que par isolement d'un milieu biologique [35, 262]. Nous avons adopté ici la méthode biologique et opéré dans des conditions voisines de celles décrites par BOREK et WAELSCH [35] ; notre préparation a cependant été obtenue à partir de foies de lapin.

Nous avons pu constater par chromatographie que le résultat de ces opérations est un mélange constitué en majorité par FAG et des quantités relativement élevées d'acide glutamique et d'acide formylglutamique. Aussi avons-nous procédé à une nouvelle séparation sur colonne de notre produit, cette fois sur Dowex 50 $\times$ 6, sous sa forme H⁺, suivant la méthode de SILVERMAN et collaborateurs [262], mais avec les modifications de TABOR et MEHLER [284].

Nous avons suivi la séparation sur cette colonne par des dosages à la ninhydrine [202] ou au nitroprussiate [225] et, après élimination du sulfate par Ba⁺⁺ et lyophilisation, nous avons obtenu une préparation d'acide formamidinoglutarique ne contenant que de faibles quantités des acides formylglutamique et glutamique et qui donnait le résultat suivant à l'analyse élémentaire :

	Théorique pour C ₆ H ₁₀ O ₄ N ₂ , H ₂ O	Trouvé
C	37,5 %	39,5 %
H	6,3 %	7,3 %
N	14,6 %	14,8 %

Le produit extrêmement hygroscopique, a été conservé en dessiccateur sur P₂O₅, au froid..

II-A 2. — Acide formylglutamique.

L'acide formylglutamique (point de fusion non corrigé : 112-113° C) a été préparé suivant la méthode de TABOR et MEHLER [284].

Notre produit présente un point de fusion corrigé de 111° C et son analyse élémentaire a donné les résultats suivants :

	Théorique pour $C_6H_9O_5N$	Trouvé
C	41,1 %	43,5 %
H	5,2 %	5,6 %
N	8,0 %	7,9 %

L'analyse chromatographique du produit montre que l'acide formylglutamique est accompagné d'une très faible quantité d'acide glutamique, ce qui expliquerait le chiffre un peu trop élevé du carbone dans l'analyse.

II-A 3. — Acide imidazylacétique.

L'acide imidazylacétique (point de fusion non corrigé : 217-219° C) a été synthétisé par plusieurs auteurs [177, 216, 283] et isolé après dégradation biologique de l'histidine [51, 313] et de l'histamine [36, 177, 282, 283, 285]. Comme nous l'avons indiqué déjà (page 34) l'acide imidazylacétique est dégradé en acide formylaspartique par les organismes animaux [120, 121].

L'acide imidazylacétique que nous avons utilisé dans notre expérimentation a été isolé à partir d'un milieu biologique après dégradation enzymatique de l'histidine. De la L-aminoacidoxydase, présente dans l'hépatopancréas de *Mytilus edulis* L. [237], a été partiellement purifiée après séparation sur colonne de cellulose. Son action sur l'histidine conduit à l'acide imidazylpyruvique, lequel est spon-

tanément décarboxylé en acide imidazylacétique dans les préparations. Nous avons pu isoler et identifier l'acide imidazylacétique à l'état pur (point de fusion 216-218° C. (290')).

II-A 4. — Acide imidazyapyruvique.

L'acide imidazyapyruvique étant extrêmement instable, nous ne sommes pas arrivés à l'isoler d'un milieu biologique en quantité suffisante pour notre expérimentation.

Aussi nous l'avons synthétisé et obtenu sous forme de bromhydrate, $C_6H_6N_2O_3 \cdot BrH$, donnant à l'analyse élémentaire [291].

	Théorique pour $C_6H_6N_2O_3 \cdot BrH$	Trouvé
C	30,7 %	31,1 %
H	3,0 %	3,0 %
N	11,9 %	11,2 %
Br	34,0 %	33,0 %

II-B) Synthèse des dérivés de la glycine.

II-B 1. — Formylglycine.

La synthèse de formylglycine (point de fusion : 153-154° C, non corrigé) [15] a été élaborée par FISCHER et WARBURG et consiste en une simple formylation de la glycine par l'acide formique pur [72]. Nous avons suivi cette méthode, et après plusieurs recristallisations dans un mélange eau-alcool notre produit s'est montré chromatographiquement pur dans nos solvants habituels et a donné les résultats suivants à l'analyse élémentaire :

	Théorique pour $C_3H_5O_3N$	Trouvé
C	34,9 %	35,3 %
H	4,9 %	4,6 %
O	46,6 %	47,0 %
N	13,6 %	13,4 %

Point de fusion, non corrigé, 149-151° C.

II-B 2. — Glycinamide.

La glycinamide a été préparée suivant les indications de BERGEIL [22], par réaction entre le chloroacétamide et l'ammoniaque. Après plusieurs recristallisations dans l'alcool notre produit isolé sous forme de chlorhydrate (point de fusion : 186-189° C, non corrigé) [14], donne les résultats suivants à l'analyse élémentaire :

	Théorique pour $C_2H_6ON_2, Cl$	Trouvé
C	21,7 %	22,3 %
H	6,4 %	6,3 %
N	25,3 %	24,9 %
Cl	32,1 %	31,9 %

Point de fusion, non corrigé, 191-194° C. Le produit s'est montré chromatographiquement pur.

II-B 3. — Formylglycinamide, FGA.

Nous avons préparé le formylglycinamide suivant la méthode générale de N-formylation donnée par TABOR et MEHLER [284]. Avec le glycinamide de synthèse (chapitre II,

B-2) comme produit de départ, nous avons obtenu, après plusieurs recristallisations dans eau-alcool-éther, un composé cristallin qui ne donne pas de réaction avec la ninhydrine et qui ne présente, après chromatographie dans nos solvants habituels, qu'une seule tache décelable par la réaction de RYDON et SMITH [241]. Ceci indique en effet que le groupement α -aminé de la glycineamide a été substitué par le traitement à l'acide formique, et en considérant les résultats d'analyse du produit, nous sommes en droit de supposer qu'il s'agit bien du N-formylglycinamide.

	Théorique pour $C_3H_6O_2N_2$	Trouvé
C	35,3 %	35,4 %
H	5,9 %	6,1 %
O	31,3 %	31,8 %
N	27,4 %	27,2 %

Point de fusion, non corrigé, 117-118° C.

II-B 4. — Acide formamidinoacétique ou formiminoglycine, FIG.

Le dérivé formimino de la glycine (point de fusion, non corrigé, 217° C) a été synthétisé récemment par MICHEEL et FLITSCH [180, 181] à partir de la glycine et du chlorhydrate de formamidine. Nous avons suivi cette méthode en préparant préalablement la formamidine d'après CORNFORTH [58] à partir du formiminoéther (chlorhydrate) [53].

L'acide formamidinoacétique ainsi obtenu a été recristallisé deux fois dans eau-alcool-éther et se présente alors en cristaux blancs qui donnent à l'analyse élémentaire :

	Théorique pour $C_3H_6O_2N_2$	Trouvé
C	35,3 %	35,3 %
H	5,9 %	6,0 %
O	31,3 %	32,0 %
N	27,4 %	27,1 %

Point de fusion, non corrigé, 215-216° C.

Le composé obtenu ne contient que des traces de glycine.

CHAPITRE III.

INFLUENCE DE L'HISTIDINE ET DE SES MÉTABOLITES SUR LA BIOSYNTHÈSE DES PURINES.

Les conditions optima de biosynthèse des purines par *Escherichia coli* B, 54.125, ayant été établies au chapitre I, et disposant des composés dont la préparation a été décrite au chapitre II, nous étions en mesure d'étudier l'influence de l'histidine et de ses métabolites sur la formation *de novo* des purines.

A partir des données exposées dans l'introduction, il paraît clair que l'emploi d'inhibiteurs de la biosynthèse des purines peut constituer un moyen de préciser non seulement les modalités par lesquelles ils exercent leur influence, mais aussi le mécanisme de leur activation.

Nous avons étudié la biosynthèse des purines dans :

A — des cultures d'*Escherichia coli*, inhibées par la sulfadiazine,

B — des cultures d'*Escherichia coli*, inhibées par l'azaserine.

TECHNIQUES.

Souches bactériennes et conditions générales de culture.

Nous avons entrepris l'étude de l'activation que pourraient exercer l'histidine et ses métabolites sur la biosynthèse des purines en utilisant la souche d'*Escherichia coli*,

B 54.125, provenant de la collection de l'Institut Pasteur, Paris. Dans toute cette expérimentation, nous avons adopté les conditions générales de culture, exposées plus haut à propos de la biosynthèse des purines à partir de la glycine (chap. I).

Dans les cas où le milieu de culture renferme de l'histidine ou un de ses métabolites, nous avons, sauf indication contraire, évité d'ajouter de la glycine. D'une façon générale, nous avons également évité de compléter le milieu en D-ribose, des essais préalables (chap. I, page 52) ayant démontré que ce pentose n'est pas un précurseur direct des purines et que son activation conditionnelle, indirecte, est vraisemblablement liée au métabolisme du glucose.

Produits utilisés.

La synthèse d'un certain nombre de composés qui ont servi dans notre expérimentation a été exposée dans le chapitre II.

Nous avons en outre utilisé de la L(—)-histidine (monochlorhydrate), de l'acide urocanique, de l'acide L(+)-glutamique, de la glycine, de la glutamine, de l'histamine (bichlorhydrate), de l'acide folique (produits Hoffmann-La Roche). La 5 (4)-amino-4(5)-imidazolecarboxamide, AICA, employée provient de SIGMA Chemical Corp., U.S.A., la sulfadiazine de Struers Chem. Lab., Copenhague, et l'azasérine nous a été offerte par le D^r NICOLAIDES [196, 205], Parke, Davis et Comp., U.S.A.

Méthodes de dosages.

α) Dosage de l'AICA et de ses dérivés.

Nous avons pu suivre l'activation de la biosynthèse des purines en dosant les dérivés de l'AICA formés dans des cultures inhibées par la sulfadiazine. Les dosages ont été faits par la méthode de BRATTON et MARSHALL [37], qui per-

met une détermination spécifique de ces dérivés (chapitre I, page 41) même dans un milieu renfermant l'histidine et ses métabolites.

b) Dosage de l'histidine et de ses dérivés imidazoliques.

L'histidine et ses métabolites ont été dosés par la méthode d'EDLBACHER et collaborateurs [64]. Les mesures d'intensité de la coloration rouge, se développant après diazotation, ont été faites au spectrophotomètre de BECKMAN, à 450 m μ .

Nous avons également appliqué cette méthode à l'acide urocanique et à l'acide imidazylacétique ; il est alors d'une importance capitale pour la reproductibilité des résultats que le temps de diazotation soit très exactement de 3 minutes. Bien que le maximum d'absorption des composés diazo formés par ces deux derniers corps ne soit pas exactement à 450 m μ , nous avons pu effectuer également nos mesures d'absorption à 450 m μ , les courbes obtenues suivant la loi de BEER-LAMBERT à cette longueur d'onde.

La réaction d'EDLBACHER et collaborateurs consiste en une condensation entre la parachloroaniline diazotée et le dérivé imidazolique. Pour que cette condensation ait lieu, il est indispensable que l'azote-N-3, du noyau du dérivé imidazolique ne soit pas complètement substitué. Aussi est-il clair que l'AICA libre peut donner naissance à un produit coloré (violet) avec la parachloroaniline diazotée tandis qu'il n'en est pas ainsi des N-dérivés de l'AICA (-riboside et -ribotide).

Dans les cas où le milieu contient de l'AICA libre, la réaction d'EDLBACHER permet, après dosage de l'AICA par la méthode de BRATTON et MARSHALL, un dosage des autres dérivés imidazoliques. La courbe d'étalonnage de l'AICA suivant la réaction d'EDLBACHER permet de calculer l'absorption due à l'AICA libre, cette valeur, retranchée de l'absorption totale des composés diazo permet alors de déterminer l'absorption correspondant aux autres dérivés imidazoliques.

Dans les cas où notre expérimentation a déjà montré que l'AICA se trouve à l'état de riboside, nous avons pu établir les concentrations en dérivés imidazoliques par dosage direct.

c) Dosage des dérivés formiminés.

Nous avons utilisé la méthode de RABINOWITZ et collaborateurs [225] pour doser les dérivés formiminés. Cette méthode, basée sur la réaction entre le ferricyanure-nitroprussiate et le groupement amidine, $-\text{C} \begin{array}{l} \text{NH}_2 \\ \diagup \\ \diagdown \\ \text{NH} \end{array}$, en milieu alcalin, permet le dosage de l'acide formamidinoglutarique et de l'acide formamidinoacétique. Certains dérivés imidazoliques — comme l'histidine, l'acide urocanique et l'AICA — et puriques — comme l'adénine et l'hypoxanthine — réagissent également dans les conditions du dosage, tandis que les ions ammonium inhibent le développement de la coloration.

d) Mesures de la croissance bactérienne.

Nous avons suivi la croissance des cultures par des mesures de densité réalisées au moyen du spectrophotomètre Klett-Summerson, filtre 64 (rouge).

L'inoculation des bactéries a été effectuée suivant la technique décrite au chapitre I, page 40.

e) Chromatographie.

Dans certaines de nos expériences, nous avons également réalisé l'analyse chromatographique des milieux de culture. Nous avons alors utilisé essentiellement la chromatographie descendante sur papier Whatman n° 1, lavé à l'acide acétique, 2 N, décrite au chapitre I. Afin d'obtenir une séparation nette à la fois des dérivés de la glycine, dont les synthèses ont été décrites au chapitre II, et des métabo-

lites de l'histidine, nous avons été amenés à choisir d'autres solvants, que ceux déjà mentionnés (chap. I, page 41).

C'est ainsi que le mélange : alcool butylique tertiaire-acide formique-eau (70 : 15 : 15) permet une séparation satisfaisante de l'acide formamidinoglutarique, FAG, ($R_f = 0,45$), de l'acide glutamique ($R_f = 0,34$), et de l'acide formylglutamique ($R_f = 0,55$).

Les dérivés de la glycine donnent dans ce même solvant les valeurs de R_f suivantes : glycine ($R_f = 0,35$), glycina-mide ($R_f = 0,21$), formylglycinamide ($R_f = 0,60$), formyl-glycine ($R_f = 0,72$) et acide formamidinoacétique, FIG, ($R_f = 0,45$).

Dans le solvant : alcool butylique normal-acide acétique-eau (73 : 10 : 17) nous avons obtenu les valeurs de R_f suivantes : glycine ($R_f = 0,08$), formylglycine ($R_f = 0,53$), FIG ($R_f = 0,20$) et acide glutamique ($R_f = 0,09$).

Cependant, différents solvants à base de pyridine-alcool isoamylique-eau, ou : alcool propionique-eau, n'ont pas permis des séparations satisfaisantes de nos composés.

f) Révélation des chromatogrammes.

Nous avons utilisé différentes méthodes de révélation suivant le but de l'analyse. La pulvérisation sur papier des réactifs de BRATTON et MARSHALL [37] permet de déceler les dérivés de l'AICA, ainsi que la sulfadiazine (taches rouges-violettes) tandis que celle des réactifs de PAULI-EDLBA-CHER [64] opérée selon BLOCK et collaborateurs [33], révèle l'histidine et l'acide imidazylacétique (taches rouges), l'acide urocanique (tache rouge-orange) et l'AICA libre (tache bleue).

Pour détecter les ribotides éventuels dans les milieux de culture, nous avons appliqué la méthode de HANES et ISHER-wood [116], décrite au chapitre I, page 41. Les esters phosphoriques donnent une coloration bleue sur fond blanc.

La révélation par la ninhydrine [202] a été utilisée pour déceler les acides aminés, en pulvérisant sur le chromatogramme sec une solution n-butanolique de ninhydrine

(0,25 %) renfermant 1 % d'acide acétique glacial. Après séchage et chauffage à 80-100° C pendant 5 minutes, les taches apparaissent en violet sur fond blanc.

Certains dérivés d'acides aminés, tels que l'acide formylglutamique, la formylglycine et la formylglycinamide, ne se révèlent pas à la ninhydrine par la méthode indiquée ; d'autres, tels que les acides formamidinoglutarique et formamidinoacétique ne réagissent qu'après un chauffage prolongé des chromatogrammes. Nous avons pu cependant identifier l'ensemble de ces composés par la méthode de RYDON et SMITH [241], basée sur la réaction entre le groupement : —NH— (liaison peptidique, amine primaire ou secondaire, imine, amide) et le chlore :



De tels dérivés, chlorosubstitués, réagissent facilement avec l'iodure de potassium, en libérant de l'iode moléculaire :



La technique de révélation consiste en un séchage, éventuellement complété d'un chauffage très soigneux du chromatogramme, par une ventilation de 24 heures interrompue seulement par 2 chauffages à 50-60° C pendant 5-10 minutes. Le chromatogramme est ensuite placé dans un bocal saturé de chlore, préalablement séché, pendant 10 minutes. Après aération prolongée, ventilation pendant 1 heure, on vaporise sur le papier une solution aqueuse d'iodure de potassium (1 %) et d'amidon (1 %). L'iode libéré réagit avec l'amidon en formant des taches bleu-marron-noir sur fond légèrement bleuté. Cette méthode peut être appliquée même à des chromatogrammes déjà révélés par le réactif à la ninhydrine.

Au cours des analyses chromatographiques, nous nous sommes également servis de la méthode de RABINOWITZ et collaborateurs [225] pour déceler les composés formiminés. Avec les réactifs utilisés pour cette méthode, les taches de formiminoglycine (FIG) et d'acide formamidinoglutarique (FAG) apparaissent en rouge sur fond jaune.

III-A : Rapport entre l'histidine et ses métabolites et les purines, dans des cultures d'*Escherichia coli* B. 54.125. inhibées par la sulfadiazine.

A-1 : Rapports généraux.

A-1-a : ACTIVATION DE LA FORMATION DE L'AICA-RIBOSIDE.

L'étude des rapports entre l'histidine et ses métabolites d'une part, les purines de l'autre, a été poursuivie dans des conditions de culture identiques à celles qui avaient permis d'obtenir une formation maxima d'AICA-riboside aux dépens de la glycine.

Nous avons tout d'abord cherché à mettre en évidence l'activation globale qu'exerceraient l'histidine et ses métabolites sur la formation de l'AICA-riboside. Pour cela, nous avons remplacé la glycine (concentration $0,75 \times 10^{-3}$ M.) par différents autres corps, tous à la concentration $0,75 \times 10^{-3}$ M. Dans chaque série d'expériences, nous avons effectué parallèlement des cultures, avec et sans glycine, qui ont servi de témoins.

En raison de l'instabilité des corps tels que l'acide formamidinoglutarique (FAG), l'acide formamidinoacétique (FIG) et la formylglycinamide, il a été impossible de stériliser un milieu contenant ces composés. Pour nous assurer de la stérilité de nos cultures au départ, nous avons alors procédé de la façon suivante :

Dans chaque fiole, destinée à recevoir un de ces corps thermolabiles, on a placé 9,5 ml. du milieu complet (sulfadiazine, sels et glucose) et les fioles ont été stérilisées. Le produit devant compléter le milieu a été pesé préalablement (2 jours avant) dans un tube à essai stérile et gardé au froid (-5°) jusqu'au moment de l'inoculation, moment où il a été dissous dans un milieu stérile pour préparer une solution de concentration égale à $20 \times 0,75 \times 10^{-3}$ M. 0,5 ml. de celle-ci a été ensuite prélevé stérilement et ajouté aux fioles stériles pour compléter le volume total à 10 ml., la concentration du corps supplémenté étant alors égale à

$0,75 \times 10^{-3}$ M. Nous avons vérifié que cette méthode donnait des cultures stériles au départ, car nous n'avons jamais constaté de développement microbien dans des fioles témoin, même conservées à 37° C pendant 15 heures.

Après un temps de culture de 11 heures, nous avons ramené les milieux au volume initial, avant d'effectuer les mesures de densité bactérienne, les dosages d'AICA et des autres dérivés imidazoliques.

Le tableau III résume les résultats obtenus dans 11 séries semblables où chaque expérience (N° 1 à 11) correspond à 5 ou 10 essais. La quantité d'AICA formée en présence de glycine (moyenne de $0,4-0,5 \mu\text{M}$ par 10 ml.) étant prise comme unité, nous avons exprimé l'accumulation d'AICA-riboside dans les autres cultures par rapport à elle.

TABLEAU III.

N° de l'expérience	Supplément dans le milieu ordinaire	AICA formé	μM corps imidazolique disparu par rapport aux μM d'AICA formé
1	sans supplément — témoin	0,25	—
2	glycine	1,0	—
3	histidine	1,0	1,7
4	acide urocanique	1,75	2
5	acide formamidinoglutarique	1,75	—
6	acide formylglutamique	1,0	—
7	acide glutamique	1,25	—
8	acide imidazylpyruvique	2,0	—
9	acide imidazylacétique	2,0	1,8
10	acide aspartique	0,75	—
11	acide imidazylcarboxylique	1,25	—

Dans certains cas, nous avons également mesuré la disparition des dérivés imidazoliques ajoutés au milieu et nous avons exprimé le rapport des micromoles de corps

imidazoliques disparus aux micromoles d'AICA formé. En raison de la présence de sels d'ammonium dans le milieu, lesquels inhibent la réaction de nitroprussiate avec les dérivés formiminés [225], nous n'avons pu établir ce même rapport pour des cultures qui contiennent le FAG.

A-1-b : RAPPORT ENTRE LE MÉTABOLISME DE L'HISTIDINE
DANS DES CULTURES NORMALES ET INHIBÉES
PAR LA SULFADIAZINE.

Des cultures réalisées identiquement à celles que nous venons de décrire, mais dans un milieu sans sulfadiazine et avec pour seul supplément de l'histidine ou de l'acide urocanique, ont permis de constater que les dérivés imidazoliques sont alors beaucoup moins métabolisés (tableau IV).

TABLEAU IV

Supplém. $0,75 \times 10^{-3}$ M	Inhibiteur $0,5 \times 10^{-4}$ M	Densité bactérienne après 12 heures	AICA accum. μ M/ml	Dérivé imidaz. disparu μ M/ml
Histidine	—	153	0	0,06
Histidine	Sulfad.	64	0,05	0,08
Ac. Uroc.	—	144	0	0,07
Ac. Uroc.	Sulfad.	74	0,08	0,15

En effet, la disparition du dérivé imidazolique dans des cultures sans inhibiteur ne représente que 60-70 % de celle observée dans des cultures inhibées, où la croissance est pourtant bien inférieure (65 %).

Si l'on compare ces deux types de cultures, sans et avec sulfadiazine, et surtout si on les compare à densité bactérienne égale, on constate que l'utilisation de l'histidine ou de l'acide urocanique est sensiblement supérieure lors de l'inhibition par la sulfadiazine, c'est-à-dire lorsque l'activité biologique des microorganismes est orientée vers la biosynthèse des purines.

A-1-c : RAPPORT ENTRE L'HISTIDINE ET SES MÉTABOLITES
ET LES PURINES EN FONCTION DE LA DURÉE DE CULTURE.

Nous venons de montrer que l'histidine et certains de ses métabolites activent la formation d'AICA-riboside dans des cultures d'*Escherichia coli* à un degré égal ou supérieur à celui observé avec la glycine.

Ces faits nous ont amenés à étudier de plus près le mécanisme de l'activation et nous avons cherché à établir les diagrammes de croissance de la bactérie dans les cas où le développement de cette dernière s'effectue aux dépens de l'histidine ou de ses métabolites. Nous avons alors contrôlé l'état des cultures par des prélèvements (moyenne de 5-10 fioles) à des temps différents. Les fioles où la croissance a été arrêtée à une même heure ont été réunies et ramenées à leur volume total de départ (50-100 ml.) ; après centrifugation, nous avons effectué les différentes mesures et dosages sur le liquide surnageant. Nous avons également analysé par chromatographie les milieux de culture après incubation et constaté que tout l'AICA se trouve à l'état de riboside, comme dans des cultures supplémentées en glycine (chap. I).

Les diagrammes de culture A (histidine) et B (acide urocanique), fig. 10, montrent que le métabolite imidazolique introduit dans le milieu de culture disparaît parallèlement à l'augmentation de la densité bactérienne et à la formation *de novo* de l'AICA-riboside.

Il est important de remarquer pour cette étude que la disparition du dérivé imidazolique ajouté s'arrête ou est minima au moment où l'inhibition de la croissance est totale et où les cultures deviennent non-proliférantes sous l'action de la sulfadiazine. Nous avons déjà, dans l'introduction de ce chapitre, exposé que l'on constate dans des cellules non-proliférantes un arrêt des synthèses *de novo* (en particulier des purines), tandis que les autres activités biologiques des cellules (dégradations enzymatiques, etc...) peuvent ne pas être modifiées. Aussi y-a-t-il lieu de remarquer ici que la disparition de l'histidine ou de ses métabo-

lites dans les cultures demeure exactement parallèle à la formation *de novo* de l'AICA-riboside pendant toute la croissance et qu'elle s'arrête au moment où les cellules deviennent non-proliférantes (après 10-11 heures). Ce fait

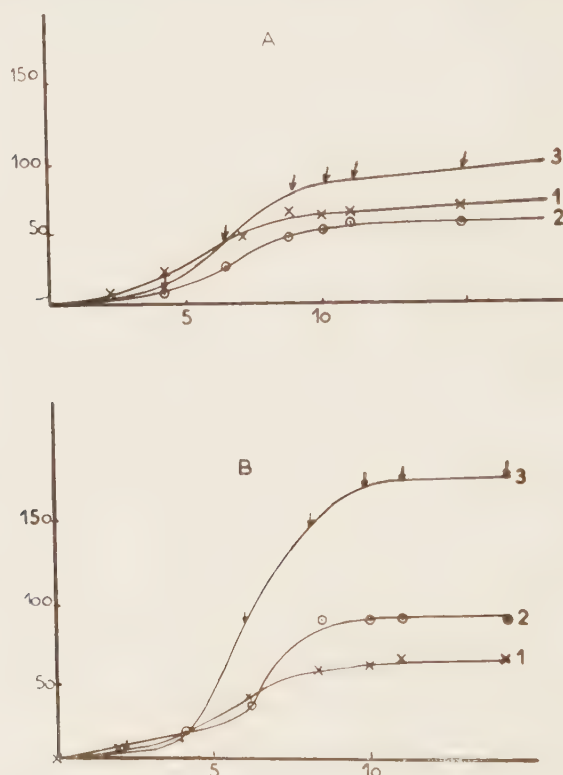


FIG. 10.

Evolution des cultures d'*Escherichia coli* B, 54.125, dans un milieu synthétique [273] supplémenté en histidine (A) ou en acide urocanique (B). Ces suppléments se trouvent à une concentration égale à $0,75 \times 10^{-3}$ M.

Courbes 1 : Densités bactériennes.

Courbes 2 : Accumulations en AICA-riboside.

Courbes 3 : Disparitions soit de l'histidine (A), soit de l'acide urocanique (B).

Abscisses : Temps de culture (heures).

Ordonnées : Pour les courbes 1 : mesures au spectrophotomètre Klett-Summerson.

Pour les courbes 2 et 3 : 10^{-3} μ M/ml.

semble indiquer que le microorganisme utilise avant tout à des fins de synthèse les composés imidazoliques ajoutés au milieu.

A-1-d : FORMATION DE L'AICA-RIBOSIDE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION DE L'HISTIDINE OU DE SES DÉRIVÉS.

Afin d'étudier de plus près le mécanisme d'activation de la formation de l'AICA-riboside, qui se manifeste dans des cultures d'*Escherichia coli* quand le milieu de croissance est supplémenté en histidine ou en acide urocanique, il nous a paru important de rechercher si cette activation était fonction de la concentration des dérivés imidazoliques. Aussi avons-nous effectué des cultures avec des milieux renfermant de l'histidine ou de l'acide urocanique à des concentrations comprises entre 0 et $1,0 \times 10^{-3}$ M.

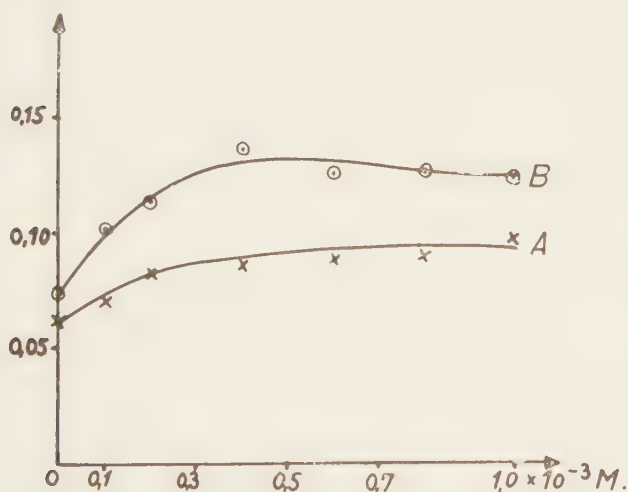


FIG. 11.

Formation de l'AICA-riboside en fonction de la concentration en dérivé imidazolique supplémenté dans le milieu synthétique.

Courbe A : histidine ; Courbe B : acide urocanique.

Durée de culture : 10 heures.

Abscisses : Concentrations en suppl. imidazolique.

Ordonnées : Dosages Bratton et Marshall (mesures d'AICA-riboside).

Comme l'indiquent les courbes A (histidine) et B (acide urocanique) de la fig. 11, on observe des maxima de formation d'AICA à des concentrations inférieures à celle trouvée pour la glycine, soit $0,4-0,5 \times 10^{-3}$ M, aussi bien pour l'histidine que pour l'acide urocanique, contre $0,75 \times 10^{-3}$ M, pour la glycine.

Ces résultats, tout en étant en accord avec ceux obtenus sur l'activation générale de la formation de l'AICA-riboside par l'histidine et ses dérivés, semblent indiquer que l'influence de ces derniers composés n'est pas due à une action catalytique.

A-1 : Conclusions.

Ces résultats forment, avec ceux obtenus sur l'activation de la formation de l'AICA-riboside en fonction du temps et la disparition simultanée de l'histidine et de l'acide urocanique, un ensemble de données paraissant indiquer qu'il existe un rapport entre le métabolisme de l'histidine et la biosynthèse des purines. Les recherches que nous avons entreprises à ce sujet forment l'objet des chapitres suivants.

A-2 : Mécanisme d'activation de la formation des purines par l'histidine et ses métabolites.

Introduction.

Nous avons déjà signalé (page 34) que l'histidine et ses métabolites (les acides urocanique et formamidinoglutarique, FAG) sont des donateurs de « formyle actif » connus ; à ce titre, ils peuvent servir à la biosynthèse des purines. Dans le schéma exposé plus haut (page 28), nous avons examiné deux possibilités de transformylation pouvant intervenir dans la formation *de novo* des purines, la première au stade de la réaction :



la deuxième à celui de la réaction :

AICA-ribotide $\longrightarrow$ acide inosinique.

Les résultats rapportés au chapitre III, A-1, mettant en évidence l'action activatrice de l'histidine et de ses métabolites sur la formation de l'AICA-riboside, indiquent que ces dérivés interviennent — bien que d'une façon encore mal précisée — dans les réactions qui précèdent la deuxième transformylation. Ils semblent en outre indiquer que, dans les conditions de culture adoptées (souche, inhibition, etc...), l'histidine et ses métabolites ne favorisent pas la réaction :

AICA-ribotide $\longrightarrow$ acide inosinique.

A-2-a : HISTIDINE ET ACIDE UROCANIQUE,

DONATEURS DE « FORMYLE » DANS NOS CONDITIONS DE CULTURE.

Cette manière de voir se confirme lorsque des cultures sont réalisées dans un milieu complet, en présence de sulfadiazine, mais sans aucune autre addition. Après 11 heures, lorsque les bactéries deviennent non-proliférantes et que la formation de l'AICA-riboside est arrêtée, nous avons ajouté stérilement à chaque fiole 0,5 ml. d'une solution stérile d'histidine ou d'acide urocanique (concentration $20 \times 0,75 \times 10^{-3}$ M). Les fioles ont été à nouveau placées à 37° et des prélèvements en fonction du temps ont alors été effectués, en moyenne 5-10 fioles, selon une technique décrite au chapitre III, A-1-c.

Dans de telles cultures, les quantités d'AICA-riboside présentes après les 11 premières heures ne subissent aucun changement après l'addition des suppléments imidazoliques. Les dosages des dérivés imidazoliques montrent également qu'ils ne sont que très peu métabolisés et la densité bactérienne demeure presque stationnaire.

Aussi devient-il clair que l'histidine et ses métabolites sont incapables d'antagoniser l'effet inhibiteur de la sulfadiazine, c'est-à-dire que ces dérivés ne peuvent servir de donateurs de « formyle » pour la réaction AICA-ribotide $\longrightarrow$ acide inosinique, dans les conditions adoptées.

**À-2-b : HISTIDINE ET ACIDE UROCANIQUE,
DONATEURS DE « FORMYLE » EN LA PRÉSENCE D'ACIDE FOLIQUE.**

Nous avons signalé (page 23) qu'un dérivé de l'acide folique paraît être un cofacteur indispensable des transformylations et que l'effet de la sulfadiazine était justement une inhibition de la biosynthèse de l'acide folique.

En conséquence, nous avons alors réalisé d'autres cultures, identiques à celles que nous venons de décrire, mais où nous avons soit supplémente préablement (avant le temps de culture normal de 10-11 heures) le milieu en acide folique (1 γ /ml.) soit ajouté de l'acide folique et un dérivé imidazolique (après les 11 premières heures), toujours afin d'obtenir l'acide folique à une concentration finale de 1 γ /ml.

Nous n'avons dans aucune de ces deux sortes de cultures constaté de différences par rapport à celles sans acide folique (chapitre A-2-a).

**A-2-c : ACTION D'AUTRES DONATEURS DE « FORMYLE »
EN LA PRÉSENCE OU EN L'ABSENCE D'ACIDE FOLIQUE.**

Des essais analogues, mais ne comportant qu'un seul prélèvement des fioles, 12 heures après l'addition d'autres donateurs de « formyle », ont été effectuées avec divers corps: bétaïne, choline, créatine, formiate, méthionine, sarcosine, sérine. Tous ont donné des résultats semblables à ceux que nous venons de décrire pour l'histidine et ses métabolites, soit un arrêt de la croissance et une absence de modification dans la concentration en AICA-riboside après addition de donateurs de « formyle ».

A-2 : Conclusions.

L'ensemble des résultats montre que, dans les conditions expérimentales choisies, ni l'histidine, ni ses métabolites, ni aucun des autres donateurs de « formyle » cités plus haut, ne réalisent la transformylation de l'AICA-ribotide pour

former l'acide inosinique, même dans le cas où le milieu a été supplémenté en acide folique.

Les résultats que nous venons d'exposer complètent ceux obtenus par d'autres groupes de chercheurs [17, 18, 24, 97, 99], mais ils ne doivent pas pour autant être interprétés comme étant en opposition avec ceux de GREENBERG et coll. [111], de MILLER et WAELSCH [183, 184] et de RABINOWITZ et coll. [221, 222, 223]. En effet, ces auteurs ont travaillé uniquement *in vitro* et dans des conditions d'anaérobiose strictes, où l'acide tétrahydrofolique, qui est le véritable cofacteur des transformylations, est stable.

Des résultats, obtenus par CUTTS et RAINBOW [60], ont cependant montré que la méthionine, l'adénine et l'histidine sont capables d'antagoniser — d'une manière non-compétitive — l'inhibition par les sulfamides de la croissance de *Saccharomyces cerevisiae*, de *Kloeckeria brevis*, et de *Schizosaccharomyces octosporus*.

L'ensemble de ces données nous amène à conclure que l'histidine et ses métabolites sont des donateurs de « formyle », mais que nos conditions de culture — ainsi que celles de certains des autres auteurs [17, 18, 24, 97, 99] — ne permettent peut-être pas la transformation de l'acide folique ajouté en acide tétrahydrofolique, THFA ; telle serait la raison pour laquelle nous ne pouvons pas obtenir une transformylation sur l'AICA-riboside (sub. -ribotide) en utilisant l'histidine ou ses métabolites comme donateurs de « formyle ».

En conclusion, nous pouvons résumer comme suit nos résultats avec des cultures d'*Escherichia coli* B, 54.125 :

- 1) L'histidine et ses métabolites activent d'une façon certaine la biosynthèse des purines ;
- 2) Cette activation se manifeste à un stade qui précède la transformylation : AICA-ribotide → acide inosinique, puisque nous obtenons une activation nette de la formation de l'AICA-riboside ;
- 3) Dans les conditions de cultures adoptées, l'histidine et ses métabolites, ainsi qu'un certain nombre d'autres dona-

teurs de « formyle » connus, ne peuvent pas antagoniser l'inhibition exercée par la sulfadiazine.

A-3 : Mécanisme d'activation de la formation de l'AICA-ribotide par l'histidine et ses dérivés.

Nous avons orienté nos recherches ultérieures vers le mécanisme de l'activation de la biosynthèse de l'AICA-riboside par l'histidine et ses métabolites. Deux possibilités que nous examinerons successivement s'offraient à nous :

- 1°) une donation de « formyle », permettant la réaction :
glycinamide-ribotide $\longrightarrow$ formylglycinamide-ribotide
- 2°) une participation plus complexe de l'histidine et de ses métabolites à la biosynthèse de l'AICA-ribotide.

A-3-a : HISTIDINE ET SES MÉTABOLITES, DONATEURS DE « FORMYLE » DANS LA BIOSYNTHÈSE DE L'AICA-RIBOTIDE.

Dans les expériences que nous avons effectuées sur l'activation qu'exercent l'histidine et ses métabolites sur la biosynthèse de l'AICA-riboside dans des cultures d'*Escherichia coli* B, 54.125, rien ne s'oppose à ce que cette activation soit due à une simple donation de « formyle » au stade de la réaction :

glycinamide-ribotide $\longrightarrow$ formylglycinamide-ribotide.

En effet, nos résultats négatifs sur les possibilités de l'histidine et ses métabolites à servir comme donateurs de « formyle » dans la fermeture du noyau pyrimidique de l'acide inosinique, n'excluent pas forcément que ces mêmes composés puissent participer à une transformylation à un autre stade de la biosynthèse des purines. Ceci peut, au premier abord, paraître paradoxal, car la présence de la sulfadiazine, inhibant la biosynthèse de l'acide folique, et l'aérobiose gênent la formation de l'acide tétrahydrofolique, corps extrêmement oxydable dont la présence est indispensable à la transformylation.

Cependant, GREENBERG [105, 112] rapporte, dans ses travaux sur la biosynthèse de l'AICA-riboside, que l'inhibition des réactions transformylantes par la sulfadiazine s'effectue à deux stades de la biosynthèse des purines, le premier :

AICA-ribotide ———> acide inosinique,
qui serait le plus sensible à l'inhibiteur, et
le deuxième :

glycinamide-ribotide ———> formylglycinamide-ribotide
qui paraît l'être moins.

Selon cette interprétation, il devient logique de penser que l'AICA-riboside (sub. -ribotide) s'accumule en premier lieu dans des cultures des microorganismes inhibées par la sulfadiazine. Plus tard, avec des cultures prolongées au delà de 11 heures, où l'inhibition de la deuxième transformylation est à son tour devenue totale, une accumulation du ribotide du dérivé de la glycine pourrait alors s'effectuer.

Pour GREENBERG, le stock normal de cofacteur nécessaire aux transformylations que possèdent les bactéries pendant les premières heures de croissance est utilisé de façon préférentielle à la réaction :

glycinamide-ribotide ———> formylglycinamide-ribotide
et permet l'accumulation de l'AICA-riboside. Après 11 heures de culture, ce stock pourrait être épuisé, et toute possibilité de transformylation écartée, on constaterait alors une accumulation de glycinamide-ribotide.

Tenant compte de ces résultats, il devient possible d'attribuer à l'histidine et ses métabolites le rôle de donateurs de « formyle » pendant un temps de culture limité. Ce temps de culture peut, avec notre microorganisme, être fixé à 11 heures après l'inoculation, car nous observons à ce moment un arrêt dans la formation de l'AICA-riboside. Ce moment doit, d'après les résultats de GREENBERG, coïncider également avec l'inhibition totale de la transformylation :

glycinamide-ribotide ———> formylglycinamide-ribotide.

Nous avons abordé de la manière suivante l'étude des possibilités pour l'histidine et ses métabolites de servir de donateurs de « formyle » dans cette réaction.

Nous avons réalisé des cultures inhibées par la sulfadiazine, dans un milieu renfermant de l'histidine (ou un métabolite de l'histidine) et l'un des dérivés de la glycine, corps reconnu comme étant un précurseur des purines (voir schéma page 28). Chaque produit supplémentaire a été à une concentration finale de $0,75 \times 10^{-3}$ M. et, à la suite des raisonnements développés plus haut, nous avons adopté un temps de culture de 11 heures. Nos résultats sur la formation de l'AICA-riboside sont exprimés par rapport à une unité de référence, qui est la quantité d'AICA-riboside qui s'accumule dans des cultures contenant seulement de la glycine. La densité bactérienne est exprimée par les mesures obtenues au spectrophotomètre Klett-Summerson avec filtre rouge (N° 64).

Nos résultats, résumés dans le tableau V, montrent que l'histidine et ses métabolites (acide urocanique, acide formamidinoglutarique) conservent leur pouvoir activateur vis-à-vis de la formation de l'AICA-riboside — même dans le cas où le milieu de culture a été supplémenté en un des dérivés de la glycine, précurseurs reconnus de l'AICA. En effet, si l'on compare les résultats rassemblés dans le tableau V avec ceux obtenus sur des cultures dont le milieu a été supplémenté en histidine seule ou en un de ses métabolites seul (tableau III), on constate que l'accumulation de l'AICA-riboside est activée identiquement dans les deux séries, par rapport aux essais en présence de glycine seule (témoins).

Au cours de ces expériences, nous avons cependant cherché, en particulier, à déterminer si l'histidine et ses dérivés interviennent dans la biosynthèse de l'AICA-ribotide par une donation de « formyle », notre attention a donc porté particulièrement sur les cultures contenant comme dérivé de la glycine, soit de la glycynamide, soit la formylglycynamide (FGA). La donation de « formyle » se manifesterait en effet entre les ribotides de ces deux composés.

Nos résultats ne semblent cependant pas pouvoir résoudre ce problème, car nous constatons que l'activation de la formation de l'AICA-riboside exercée par l'histidine et ses

TABLEAU V.

N° d'Exp.	Dérivé de glycine. ($0,75 \times 10^{-3}$ M)	Autres Suppléments ($0,75 \times 10^{-3}$ M)	Densité bacté- rienne	AICA- ribos. formé
1	—	—	28-30	0,25
2	Glycine	—	95-98	1,0
3	Glycine	Histidine	105	1,3
4	Glycine	Ac. Urocanique	115	1,6-1,9
5	Glycine	FAG	107	1,8-2,0
6	Glycine	Ac. Formylglutamique	109	1,1-1,3
7	Glycine	Ac. Glutamique	107	1,2-1,5
8	Formylglycine	—	60-65	0,7
9	Formylglycine	Histidine	102	1,3-1,5
10	Formylglycine	Ac. Urocanique	103	1,4-1,5
11	Formylglycine	FAG	109	1,5-1,6
12	Formylglycine	Ac. Formylglutamique	74	0,7
13	Formylglycine	Ac. Glutamique	99	1,3
14	Glycinamide	—	97	1,0
15	Glycinamide	Histidine	104	1,1-1,2
16	Glycinamide	Ac. Urocanique	104	1,8
17	Glycinamide	FAG	107	1,9-2,0
18	Glycinamide	Ac. Formylglutamique	100	1,0
19	Glycinamide	Ac. Glutamique	102	1,3-1,4
20	FGA	—	92	0,9
21	FGA	Histidine	100	1,2
22	FGA	Ac. Urocanique	102	1,4
23	FGA	FAG	108	1,8-1,9

métabolites se manifeste non seulement avant la réaction transformylante (Exp. N° 14-17), mais aussi après celle-ci, c'est-à-dire au stade où les cultures renferment de la formylglycinamide (Exp. N° 20-23).

Aussi sommes-nous amenés à conclure de l'ensemble des résultats (tableau V) que, même si l'histidine et ses déri-

vés doivent être considérés comme des donateurs de « formyle » pour la réaction : glycineamide-ribotide $\longrightarrow$ formylglycineamide-ribotide, celle-ci ne peut — à elle seule — être responsable de toute l'activation de la biosynthèse de l'AICA-riboside. Si tel était le cas, nous n'aurions pas dû trouver une activation de la formation de l'AICA-riboside par l'histidine et ses métabolites en présence de Formylglycineamide.

A-3-b : HISTIDINE ET SES METABOLITES,
DONATEURS DU GROUPEMENT « FORMIMINO ».

La possibilité pour l'histidine et ses métabolites de participer à la formation de l'AICA-riboside par un mécanisme autre qu'une donation de « formyle » cadre avec un certain nombre de travaux récents, montrant le rôle biologique de la transformimination, rôle vraisemblablement plus important qu'on ne l'avait tout d'abord pensé.

Selon SAGERS [243], MAGASANIK [9, 169, 172], RABINOWITZ [218] et MILLER et WAEELSCH [183, 184], les réactions de transformimination se produisent avec des dérivés tels que l'acide formamidinoacétique et l'acide formamidinoglutarique, jouant le rôle de donateurs du groupement « formimino » et l'acide tétrahydrofolique, cofacteur indispensable à la réaction (page 34).

Mais, dans l'hypothèse où l'histidine et ses métabolites participeraient à une réaction de transformimination, celle-ci ne suivrait pas exactement le schéma connu de la biosynthèse des purines (page 28). En particulier, elle ne consisterait pas en un transfert du groupement « formimino » sur le glycineamide-ribotide conduisant à la formation de formiminoglycineamide-ribotide, dont un atome d'azote excédentaire devrait être libéré sous forme d'ammoniaque au moment de la fermeture du noyau imidazolique. La transformimination reviendrait ainsi à une simple donation de « formyle », insuffisante pour expliquer toute l'activation de la biosynthèse des purines par l'histidine et ses métabolites.

La transformimination à partir de l'histidine et de ses métabolites, pourrait, si elle existe, consister en la formation de formiminoglycine, cyclisable en imidazolone, laquelle — par amination — aboutirait au 4(5)-aminoimidazole, précurseur de l'AICA. Ce mécanisme serait ainsi l'inverse de la dégradation enzymatique de la xanthine, étudiée par RABINOWITZ et coll. [217, 225], et qui donne successivement naissance au 4(5)-aminoimidazole et à la formiminoglycine.

Dans ce cas et en présence d'histidine ou d'un de ses métabolites, la formiminoglycine pourrait se former par une transformimination à partir de la glycine et l'acide formiminoglutamique ou l'acide formiminoaspartique. La glycine elle-même proviendrait du glucose, et le donateur de groupement « formimino » — qu'il soit l'acide formiminoglutamique ou l'acide formiminoaspartique — de l'histidine après l'ouverture du noyau imidazolique.

Nous avons cherché à mettre en évidence de telles réactions dans des cultures d'*Escherichia coli* B, 54.125. La formiminoglycine de synthèse (FIG) a été ajoutée au milieu de culture (conc. finale de $0,75 \times 10^{-3}$ M.) — seule ou avec l'histidine ou l'un de ses métabolites. Le tableau VI résume les résultats obtenus. Nous avons, comme précédemment, exprimé l'accumulation de l'AICA-riboside dans les différentes cultures par rapport à la quantité d'AICA formée en présence de glycine. Les densités bactériennes ont été mesurées au spectrophotomètre Klett-Summerson.

Une activation nette de la formation de l'AICA-riboside par l'histidine et ses métabolites se manifeste — même en présence du dérivé « formimino » de la glycine, tandis que ce dernier composé semble, à lui seul, incapable d'activer la biosynthèse de l'AICA-riboside.

L'activation par l'histidine ou ses métabolites en présence de FIG, légèrement moins importante que celle observée dans des cultures avec histidine et ses dérivés en présence de la glycine (tableau V, Exp. n° 2, 3, 4, 5), semble toutefois indiquer que la formiminoglycine (FIG) n'est pas un intermédiaire dans les réactions par lesquelles l'histi-

dine exerce son influence sur la biosynthèse de l'AICA-ribotide. En effet, si l'hypothèse d'une transformimination de FAG sur la glycine devait être retenue, nous aurions dû trouver dans les cultures contenant la FIG une accumulation d'AICA-riboside (Exp. n° 3) égale ou supérieure à celle que nous observons dans les cultures effectuées avec la glycine et le FAG (tableau V, Exp. n° 5).

En accord avec les résultats de SAGERS et coll. [243], de MILLER et WAELSCH [183, 184], de RABINOWITZ et coll. [218, 222, 223], et de TABOR et coll. [286], indiquant que l'acide tétrahydrofolique, THFA, est un cofacteur indispensable des transformiminations, nous avons réalisé des cultures avec la formiminoglycine (FIG) dans un milieu contenant de l'acide folique (1 γ /ml). Après 11 heures d'incubation, nous n'avons pas pu constater de différences dans la quantité d'AICA-riboside accumulée par rapport à celle observée en l'absence d'acide folique (tableau VI).

TABLEAU VI.

N°	Supplément dans le milieu	Densité bactérienne	AICA formée
1	—	37	0,4
2	Glycine	83	1,0
3	FIG	78	0,9-1,0
4	FIG + Histidine	80	1,0
5	FIG + Ac. Urocanique	78	1,2-1,3
6	FIG + FAG	89	1,4

L'influence de l'acide formamidinoacétique (FIG, ou formiminoglycine) sur la formation de l'AICA-riboside, en présence de l'histidine et ses métabolites.

L'addition des divers corps dans le milieu a été réalisée à une concentration de $0,75 \times 10^{-3}$ M.

L'accumulation d'AICA(-riboside) dans les cultures a été exprimée en prenant comme unité de mesure la quantité d'AICA formée en présence de glycine.

Temps de culture : 9 heures.

En conclusion, dans les conditions adoptées, l'action de l'histidine et de ses métabolites sur la biosynthèse de

l'AICA-ribotide ne semble pas comporter une transformatio-
mination entre la glycine et l'acide formamidinoglutarique.

III-A. — Résumé et Conclusions.

L'ensemble des résultats obtenus sur l'influence de l'his-
tidine et de ses métabolites sur la biosynthèse des purines
dans des cultures d'*Escherichia coli* B, 54.125, montre les
faits suivants :

1°) L'histidine et ses métabolites activent d'une façon
certaine la formation des purines (tableaux III et IV) ;

2°) Tout en admettant que l'histidine et ses métabolites
peuvent — dans certains cas — servir de donateurs de
« formyle » pour la réaction : AICA-ribotide $\longrightarrow$ acide
inosinique, l'histidine et ses dérivés activent également la
formation du précurseur des purines, l'AICA-ribotide ;

3°) L'action de l'histidine et ses métabolites dans la for-
mation de l'AICA-riboside n'est pas catalytique (chap.
A-1-a) ; elle est accompagnée d'une utilisation du dérivé
imidazolique parallèle à la formation de l'AICA-riboside
(chap. A-1-c). Le rapport entre la disparition de l'histidine
ou de l'acide urocanique et la formation de l'AICA-riboside
est presque constant au cours de la phase de croissance
inhibée (tableau III) ;

4°) L'action de l'histidine et ses métabolites semble être
non compétitive avec l'inhibition par la sulfamide (sulfa-
diazine) ;

5°) Tenant compte du fait que l'histidine et ses dérivés
activent la formation du précurseur des purines, l'AICA-
ribotide, nous avons étudié le mécanisme par lequel cette
activation s'effectue. Tout en n'excluant pas la possibilité
pour l'histidine et ses métabolites de servir de donateurs
de « formyle » pour la réaction : glycinamide-ribotide
 $\longrightarrow$ formylglycinamide-ribotide, une telle donation de
« formyle » se montre insuffisante pour expliquer toute
l'activation de la formation de l'AICA-riboside (tableau V).

6°) La possibilité d'un transfert de groupement « formimino » de l'acide formamidinoglutarique sur la glycine est peu vraisemblable dans les conditions adoptées (tableau VI) ;

7°) L'activation de la biosynthèse de l'AICA-riboside est plus forte pour l'acide urocanique que pour l'histidine ; elle est la plus élevée avec l'acide formamidinoglutarique. L'acide imidazylacétique est également très actif.

En conclusion, l'existence d'un rapport entre l'activation de la biosynthèse de l'AICA-ribotide et la dégradation de l'histidine ou de ses dérivés paraît manifeste. L'influence de l'histidine et ses dérivés se manifeste également au stade de formylglycinamide, ce qui semble indiquer que le mode d'action de ces corps n'est pas limité à une donation de « formyle » éventuelle au stade glycinamide-ribotide.

Aussi, dans le but de préciser le mécanisme par lequel l'histidine et ses métabolites interviennent dans la biosynthèse de l'AICA-ribotide, avons-nous eu recours à l'emploi d'un autre inhibiteur microbien, l'azasérine, qui empêche la réaction : formylglycinamide-ribotide $\longrightarrow$ formylglycinamidine-ribotide.

**

III-B : Rapport entre l'histidine et ses métabolites et les purines, dans des cultures d'*Escherichia coli* B. 54.125, inhibées par l'azasérine.

L'azasérine inhibe le transfert d'azote suivant : formylglycinamide-ribotide $\xrightarrow{\text{«NH}_3\text{»}}$ formylglycinamidine-ribotide, où selon les résultats obtenus avec N¹⁵, l'azote, provient spécifiquement du groupement amidé de la glutamine. En conséquence, l'inhibition par l'azasérine est compétitivement antagonisée par la glutamine. D'autres acides aminés, tels que le tryptophane, la phénylalanine, la tyrosine, l'acide glutamique, la leucine, la norleucine et l'isoleucine [19, 98],

peuvent également antagoniser plus ou moins efficacement l'effet inhibiteur de l'azasérine.

Cependant, dans ces cas, le rôle de l'azasérine consisterait vraisemblablement en une inhibition de l'action de la glutamine dans la biosynthèse de ces acides aminés [178]. Il convient de signaler ici les travaux de NEIDLE et WAELSCH [201] qui ont montré que l'azote amidé de la glutamine est également un précurseur de l'azote, N-1, du noyau de l'histidine.

Dans le cadre de nos recherches sur le mécanisme de l'activation de la biosynthèse des purines par l'histidine et ses métabolites nous nous sommes proposés d'étudier l'influence qu'exerceraient ces corps sur la formation des purines par *Escherichia coli* B, 54.125, inhibé par l'azasérine.

Conditions de culture.

Nous avons adopté les mêmes conditions de culture que dans nos recherches sur les conditions optima de formation d'AICA-riboside aux dépens de la glycine (chap. I) et de l'histidine et ses métabolites (chap. III-A). Le milieu synthétique de SPIZIZEN et coll. [273] a été employé pour tous nos essais réalisés dans des fioles d'Erlenmeyer de 100 ml, renfermant chacune 10 ml de milieu. L'inoculation a été effectuée à raison de 0,5 ml d'une culture adaptée, préalablement incubée avec la souche bactérienne pendant 16 heures à 37°C. Nous avons opéré dans des conditions telles que l'addition de 0,5 ml de la suspension des bactéries adaptées conduise à une densité bactérienne égale à 3-5 unités de mesure dans 10 ml (Klett-Summerson, filtre 64).

Méthodes.

Après le temps d'incubation choisi (11 ou 12 heures), nous avons réuni les 5 à 10 fioles de chaque série et ramené au volume initial (50-100 ml) par addition d'eau distillée. Des mesures de densité bactérienne ont ensuite été effectuées (chap. I, page 41) et, après séparation des bactéries par

centrifugation à froid, nous avons procédé à l'analyse du liquide surnageant.

Nous avons utilisé les mêmes méthodes de dosages que celles décrites au chap. III-A. Les analyses chromatographiques ont été réalisées au moyen des solvants et des techniques de révélations décrits à propos de l'étude des cultures inhibées par la sulfadiazine.

Expérimentation préalable.

Avant d'étudier l'influence de l'histidine et de ses métabolites sur la biosynthèse des purines dans des cultures d'*Escherichia coli* B, 54.125, inhibées par l'azasérine, nous avons tout d'abord étudié l'action de celle-ci dans des cultures réalisées sur milieu renfermant des sels et du glucose. Pour faciliter la comparaison des résultats avec ceux obtenus en présence de sulfadiazine, nous avons adopté un temps de 10 à 11 heures. De même, nous avons cherché à obtenir une inhibition de la croissance de 60-65 %.

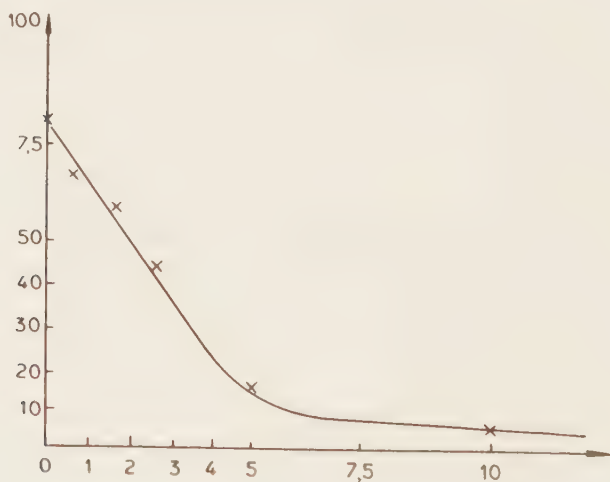


FIG. 12.

Activité inhibitrice de l'azasérine dans des cultures d'*Escherichia coli* B, 54.125, inoculé dans un milieu synthétique de sels et glucose. Temps de culture : 10 heures.
Abscisses : Concentrations d'azasérine (en γ /ml. du milieu).
Ordonnées : Densités bactériennes (mesures Klett-Summerson).

En effet, une comparaison valable des cultures, inhibées par la sulfadiazine et par l'azasérine, exige — à notre avis — que la croissance des bactéries ait été, dans les deux cas, inhibée au même degré (densités bactériennes égales aux mêmes temps). De telles conditions paraissent nécessaires pour obtenir des microorganismes d'activité physiologique égale, aussi bien en ce qui concerne la biosynthèse des purines que la participation de l'histidine et ses métabolites à celle-ci.

Le diagramme de culture (fig. 12) traduit les résultats obtenus avec *Escherichia coli* B. 54.125 après 10 heures de croissance dans un milieu synthétique, mais contenant des quantités croissantes d'azasérine (0-10 γ /ml). L'inhibition de 60 % qui, dans des cultures inhibées par la sulfadiazine, était la plus favorable à la formation de l'AICARiboside est ici réalisée à une concentration d'azasérine voisine de 3 γ /ml.

Nous avons ensuite réalisé des cultures dans un milieu témoin additionné de 3 γ /ml d'azasérine ; nos résultats, reportés sur le diagramme de la figure 13, confirment

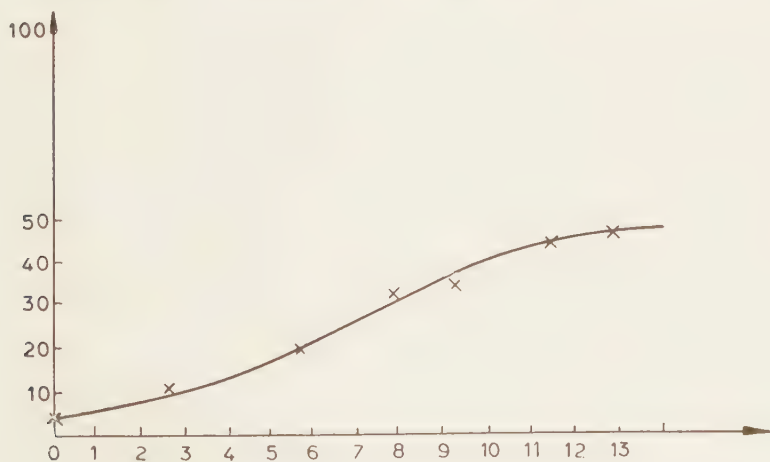


FIG. 13.

Evolution de la densité bactérienne dans des cultures d'*Escherichia coli* B, 54.125, inoculé dans un milieu synthétique contenant 3 γ /ml. d'azasérine.

Abscisses : Temps de culture (heures).

Ordonnées : Densités bactériennes (mesures au Klett-Summerson).

qu'elles deviennent stationnaires après 11-12 heures d'incubation.

Notre souche bactérienne est donc plus résistante à l'azasérine que celle utilisée par TOMISEK et coll. [292]. En effet l'inhibition totale de sa croissance ne s'effectue que dans un milieu contenant 10 γ /ml d'azasérine, tandis que 2 γ /ml d'azasérine inhibent toute croissance de la souche d'*Escherichia coli*, A.T.C.C. 9637 [292].

Sauf indication contraire, nous avons utilisé l'azasérine à raison de 3 γ /ml du milieu et adopté des temps de culture voisins de 11-12 heures.

B-I : Influence générale de l'histidine et de ses métabolites sur des cultures d'*Escherichia coli* B, 54.125, inhibées par l'azasérine.

Dans les conditions que nous venons de définir (milieu synthétique constitué par des sels et du glucose, azasérine au taux de 3 γ /ml du milieu, temps de culture : 11 heures), nous avons étudié l'influence de l'histidine et de ses métabolites sur la croissance du microorganisme. Les cultures ont été réalisées en présence soit d'histidine (ou d'un de ses métabolites) $0,75 \times 10^{-3}M$, soit des dérivés de la glycine $0,75 \times 10^{-3}M$. Après 11 heures, nous avons réuni le contenu des fioles de la même série (5 à 10) et, après avoir ramené au volume initial, réalisé les mesures de densité bactérienne. Le tableau VII résume les résultats obtenus.

L'histidine et ses métabolites, l'acide urocanique et l'acide formamidinoglutarique, antagonisent considérablement l'effet inhibiteur de l'azasérine, tandis que les acides formylglutamique et glutamique paraissent beaucoup moins actifs. Nos résultats avec la glycine et ses dérivés (Exp. n° 2-6, tableau VII) sont en accord avec le fait que l'inhibition par l'azasérine s'effectue au stade de la réaction : formylglycinamide-ribose $\rightarrow$ formylglycinamide-ribose. Nous observons également une activation nette de la croissance dans le cas de cultures, supplémen-

tées en histamine ou en acide imidazylypyruvique, tandis qu'il n'en est pas de même avec celle supplémentées en acide imidazylycarboxylique.

TABLEAU VII.

N° d'expérience	Supplément dans le milieu ($0,75 \times 10^{-3}$ M)	Densité bactérienne après 11 heures
1	—	30
2	Glycine	42
3	Formylglycine	45
4	Glycinamide	42
5	Formylglycinamide	49
6	Acide formamidinoacétique	54
7	Histidine	69
8	Acide urocanique	63
9	Acide formamidinoglutarique	72
10	Acide formylglutamique	57
11	Acide glutamique	54
12	Histamine	62
13	Acide imidazylypyruvique	62
14	Acide imidazylycarboxylique	54

**B-2 : Influence de l'histidine et de ses métabolites
en fonction de la durée de culture.**

Après avoir mis en évidence le fait que l'histidine et ses métabolites antagonisent l'inhibition exercée par l'azasé-rine dans les cultures, il a paru intéressant d'étudier cet effet en fonction du temps.

Pour cela, nous avons réalisé d'importantes séries de cul-tures, dont le milieu a été supplémenté en histidine ou bien en acide urocanique (concentrations finales $0,75 \times 10^{-3}$ M)

et nous avons contrôlé le développement des bactéries par des prélèvements (moyennes de 5-10 fioles) à des temps successifs. Des cultures témoins provenant de la même suspension de bactéries adaptées, ont toujours été réalisées en l'absence d'histidine et d'acide urocanique.

Nos résultats, exprimés par les diagrammes de croissance fig. 14 (histidine) et fig. 15 (acide urocanique) confirment

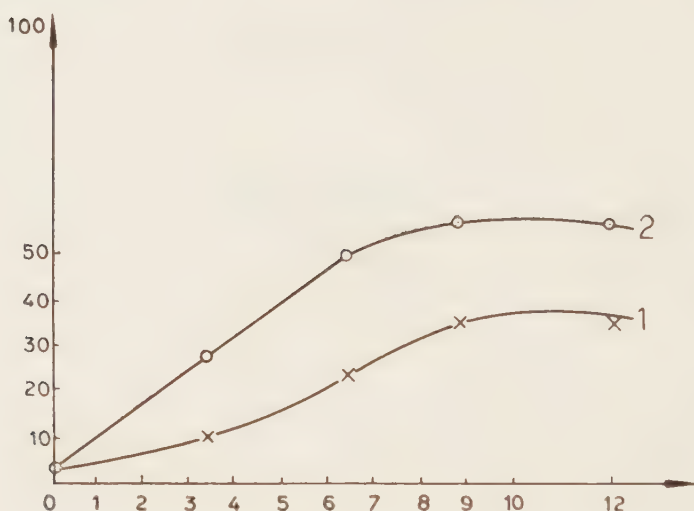


FIG. 14.

Influence de l'histidine ($0,75 \times 10^{-3}$ M) sur la croissance d'*Escherichia coli* B, 54.125 dans un milieu synthétique contenant 3 γ /ml. d'azasérine.

Courbe 1 : Culture sans supplément (témoin).

Courbe 2 : Culture avec histidine.

Abscisses : Temps de culture (heures).

Ordonnées : Densités bactériennes (mesures au Klett-Summerson).

que l'histidine et l'acide urocanique suppriment presque totalement l'effet inhibiteur de l'azasérine. En effet, la densité bactérienne des cultures témoins devient constante à un niveau qui est environ 60 % au-dessous de ceux des cultures supplémentées en histidine ou en acide urocanique.

Afin d'interpréter plus facilement les résultats obtenus plus haut, nous avons réalisé parallèlement des cultures inhibées soit par l'azasérine, soit par la sulfadiazine, soit sans inhibiteur. Les fioles de ces trois séries de cultures ont été inoculées avec les mêmes quantités de suspension bactérienne de la même culture adaptée et nous avons, comme dans les cas précédents, suivi l'évolution de la croissance par des prélèvements en fonction du temps.

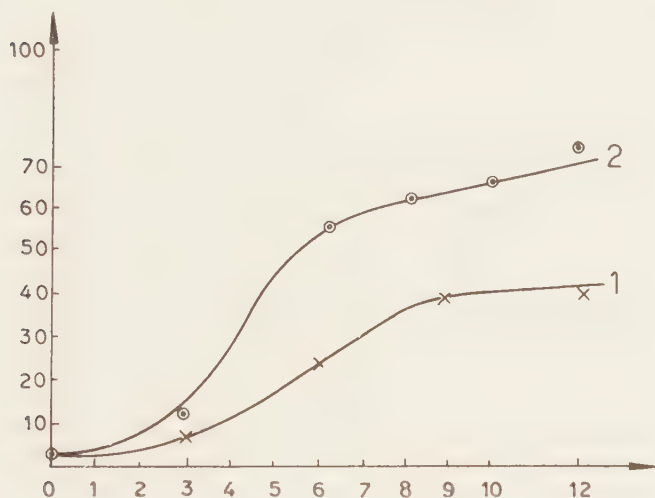


FIG. 15.

Influence de l'Acide urocanique ($0,75 \times 10^{-3}$ M) sur la croissance d'*Escherichia coli* B, 54.125 dans un milieu synthétique contenant 3 γ /ml. d'azasérine.

Courbe 1 : Culture sans supplément (témoin).

Courbe 2 : Culture avec l'acide urocanique.

Abscisses : Temps de culture (heures).

Ordonnées : Densités bactériennes (mesures de Klett-Summerson).

La comparaison des résultats, rapportés sur les fig. 16 (histidine) et 17 (acide urocanique) montre que la croissance du microorganisme est définitivement inhibée par la sulfadiazine, ce qui permet l'accumulation de l'AICArriboside, et que le développement des cultures inhibées par l'azasérine est presque normal. Ceci nous permet déjà de

différencier d'une façon certaine ces deux modes d'inhibition. La sulfadiazine bloque la formation des purines au stade de l'AICA-ribotide, et l'histidine et ses dérivés — tout en participant à la biosynthèse du ribotide de l'AICA — sont incapables d'entretenir une croissance normale. L'azasérine bloque la formation des purines au stade précédant

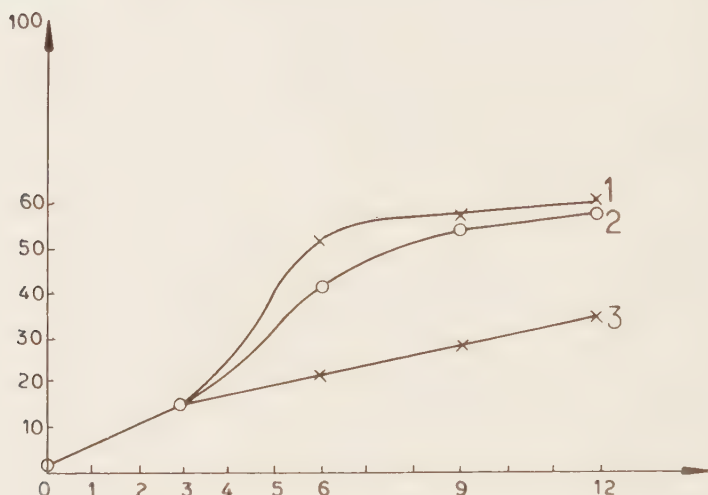


FIG. 16.

Influence de l'histidine ($0,75 \times 10^{-3}$ M) sur la croissance d'*Escherichia coli* B, 54.125 dans des milieux synthétiques contenant soit de l'azasérine (3 γ /ml.), soit de la sulfadiazine ($0,5 \times 10^{-4}$ M), soit sans inhibiteur.

Courbe 1 : Cultures sans inhibiteur (témoins).

Courbe 2 : Cultures avec azasérine.

Courbe 3 : Cultures avec sulfadiazine.

Abscisses : Temps de culture (heures).

Ordonnées : Densités bactériennes (mesures au Klett-Summerson).

la synthèse de formylglycinamidine-ribotide, mais l'histidine et ses dérivés doivent alors — par un mécanisme encore inconnu — permettre à ce dernier processus d'évoluer normalement et, par là, de permettre aux microorganismes de se multiplier normalement.

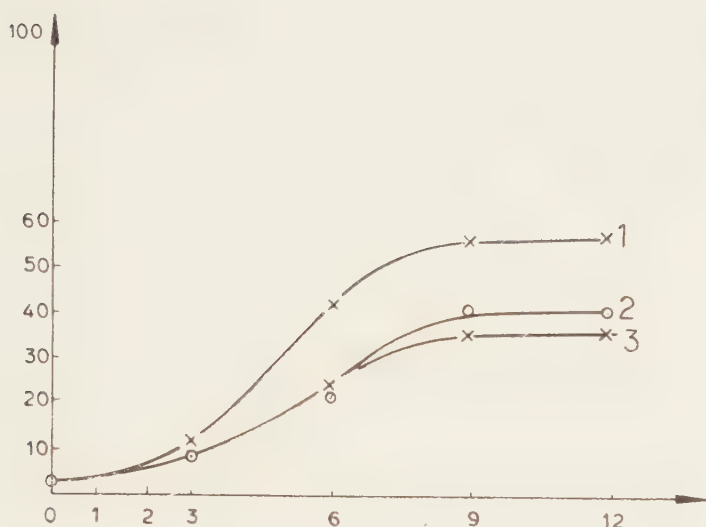


FIG. 17.

Influence de l'acide urocanique ($0,75 \times 10^{-3}$ M) sur la croissance d'*Escherichia coli* B, 54.125 dans des milieux synthétiques contenant soit de l'azaserine (3 γ /ml.), soit de la sulfadiazine ($0,5 \times 10^{-4}$ M), soit sans inhibiteur.

Courbe 1 : Cultures sans inhibiteur (témoins).

Courbe 2 : Cultures avec azaserine.

Courbe 3 : Cultures avec sulfadiazine.

Abscisses : Temps de culture (heures).

Ordonnées : Densités bactériennes (mesures au Klett-Summerson).

B-3 : Inhibition d'*Escherichia coli* par l'azaserine en fonction de la concentration du supplément.

Ayant établi que l'histidine et ses dérivés (acide urocanique, acide formamidinoglutarique, histamine, et acide imidazylpyruvique) suppriment, à un degré très élevé, l'inhibition de la croissance d'*Escherichia coli* B. 54.125 par l'azaserine, nous avons étudié le mécanisme de cet antagonisme.

Nous avons tout d'abord cherché à mettre en évidence à quelles concentrations d'histidine ou d'acide urocanique,

celui-ci se manifeste. Les diagrammes, fig. 18, montrent que l'histidine et l'acide urocanique exercent leur influence maxima déjà à des concentrations de 5×10^{-4} M. Ces résultats sont en accord avec ceux que nous avons obtenus avec des cultures, inhibées par la sulfadiazine, l'activation

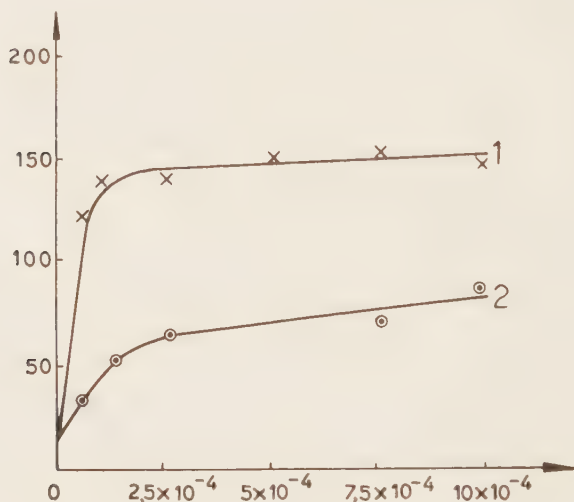


FIG. 18.

Action de l'histidine et de l'acide urocanique, en concentrations croissantes, sur des cultures d'*Escherichia coli* B 54.125, inoculées dans un milieu synthétique contenant 3 γ /ml d'azasérine.

Temps de culture : 11 heures.

Courbe 1 : cultures avec histidine.

Courbe 2 : cultures avec l'acide urocanique.

Abscisses : concentrations du supplément imidazolique.

Ordonnées : densités bactériennes (mesures Klett-Summerson).

maxima de la formation de l'AICA-riboside se manifestant pour des concentrations en histidine (ou dérivé) voisines de $0,4-0,5 \times 10^{-3}$ M.

Nos résultats avec des cultures supplémentées en histamine à des concentrations croissantes ($0,10^{-4}$ M) sont résumés dans le tableau VIII. Ils montrent que l'action de l'histamine est également une fonction de l'augmentation

de la concentration, une activation optima était observée entre 2×10^{-4} et 4×10^{-4} M.

TABLEAU VIII.

Supplément dans milieu contenant 3γ/ml. d'azasérine	Densité bactérienne (après 11 heures)
—	84
Histamine, conc. 1×10^{-5} M.	88
Histamine, conc. 1×10^{-4} M.	110
Histamine, conc. 2×10^{-4} M.	120
Histamine, conc. 4×10^{-4} M.	125
Histamine, conc. 6×10^{-4} M.	127
Histamine, conc. 10×10^{-4} M.	125

Ces faits sont en désaccord avec l'hypothèse de BURTON 50, qui attribue l'influence de l'histidine dans la biosynthèse des purines à une action catalytique ; une telle éventualité ne pourrait être retenue dans les conditions de culture adoptées.

B-4 : Action de l'histidine et de ses métabolites dans des cultures d'*Escherichia coli*, inhibées par l'azasérine à concentrations croissantes.

Nous avons également étudié l'antagonisme entre l'histidine et ses métabolites d'une part, l'azasérine de l'autre, dans des milieux de cultures contenant des quantités croissantes d'azasérine.

Nous avons tout d'abord étudié ce problème dans des milieux contenant soit de l'histidine ($0,75 \times 10^{-3}$ M) soit de l'acide urocanique ($0,75 \times 10^{-3}$ M) ; les résultats obtenus sont exprimés par les diagrammes de la figure 19. L'antagonisme presque total de l'azasérine et des dérivés imidazoliques se montre pratiquement indépendant de la concentration en azasérine. Ces faits sont donc en plein accord avec ceux, mentionnés dans le chapitre III, B-2 et B-3.

Nous avons étudié ce même problème pour l'histidine seule dans des milieux de cultures la renfermant à une concentration suboptima (10^{-3} M). Comme nous l'avons signalé plus haut, l'histidine doit se trouver dans le milieu

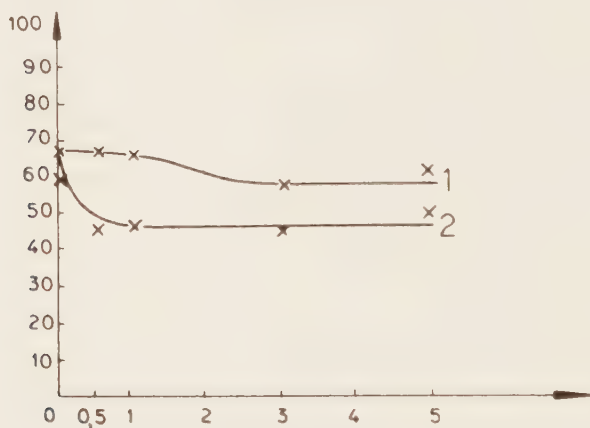


FIG. 19.

Action de l'azasérine sur la croissance de cultures d'*Escherichia coli* B, 54.125, inoculé dans des milieux synthétiques contenant soit de l'histidine ($0,75 \times 10^{-3}$ M), soit de l'acide urocanique ($0,75 \times 10^{-3}$ M).

Temps de culture : 11 heures.

Courbe 1 : Cultures avec histidine.

Courbe 2 : Cultures avec acide urocanique.

Abscisses : Concentrations d'azasérine, en γ /ml. du milieu.

Ordonnées : Densités bactériennes (mesures au Klett-Summerson).

bactérien à une concentration égale ou supérieure à $0,4 \times 10^{-3}$ M pour antagoniser presque complètement l'inhibition de la croissance par l'azasérine. Les résultats obtenus (fig. 20) montrent que, même dans des concentrations suboptima, l'histidine diminue considérablement l'inhibition de la croissance. Cet effet est indépendant de la concentration de l'azasérine à partir de 3 γ /ml.

L'histidine et ses métabolites — même à une concentration en azasérine très élevée — suppriment donc l'effet

inhibiteur de l'azasérine sur la croissance de notre souche bactérienne.

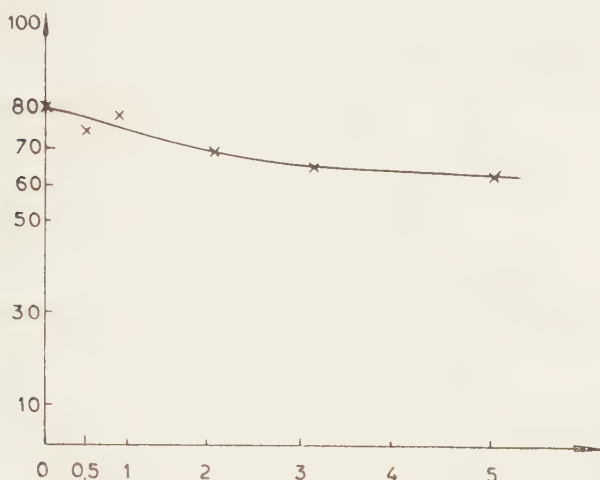


FIG. 20.

Action de l'azasérine sur la croissance de cultures d'*Escherichia coli* B, 54.125, inoculé dans un milieu synthétique contenant de l'histidine en concentration suboptima (10^{-4} M).

Temps de culture : 11 heures.

Abscisses : Concentrations d'azasérine, en γ /ml. du milieu.

Ordonnées : Densités bactériennes (mesures Klett-Summerson).

B-5 : Métabolisme de l'histidine et de ses dérivés dans des cultures d'*Escherichia coli* B, 54.125 inhibées par l'azasérine.

Il nous a paru indispensable de rechercher si l'antagonisme, exercé par l'histidine et ses métabolites, sur l'effet d'inhibiteur de l'azasérine, est accompagné d'une utilisation simultanée de ces dérivés imidazoliques.

Nous avons réalisé des cultures inhibées par 3 γ /ml. d'azasérine dans des milieux renfermant de l'histidine ou de l'acide urocanique à concentration $0,75 \times 10^{-3}$ M. Nous avons procédé à des prélèvements comme nous l'avons dé-

crit au chapitre III, B-2. Après les mesures de densités bactériennes, et après que le milieu de culture ait été centrifugé, nous avons dosé les dérivés imidazoliques dans le liquide surnageant. Ceci nous a permis de constater que l'histidine et l'acide urocanique sont métabolisés au cours de la croissance ; 0,111 $\mu\text{M}/\text{ml}$. d'histidine et 0,206 $\mu\text{M}/\text{ml}$. d'acide urocanique ont disparu en 12 heures (tableaux IX et X).

TABLEAU IX.

Temps de culture	Densités bactériennes		Dosages Histidine (0,5 ml milieu)		Histidine disparue en $\mu\text{M}/\text{ml}$
	Témoin	Histidine ($0,75 \times 10^{-3} \text{ M}$)	avant	après 11 h	
0 heure	3	3	0,475	—	—
3 h 1/2	10	28	—	0,470	0,008
6 h 1/2	20	51	—	0,450	0,040
9 h	36	57	—	0,417	0,091
12 h	33	55	—	0,405	0,111
24 h 1/2	36	55	—	0,408	0,106

TABLEAU X.

Temps de culture	Densités bactériennes		Dosages Ac. Urocan. (1,0 ml milieu)		Ac. Uroc. disparu en $\mu\text{M}/\text{ml}$
	Témoin	Ac. urocanique ($0,75 \times 10^{-3} \text{ M}$)	avant	après 11 h	
0 heure	3	3	0,450	—	—
3 »	9	14	—	0,450	0
6 »	27	59	—	—	—
8 »	—	64	—	0,435	0,024
9 »	41	—	—	—	—
10 »	—	66	—	0,330	0,190
12 »	40	72	—	0,320	0,206
24 »	40	66	—	0,295	0,245

Ces résultats présentent un intérêt particulier si on les compare à ceux obtenus dans des cultures sans inhibiteur ou inhibées par la sulfadiazine (chap. III, A-1-b). En effet, dans ces derniers cas, nous avons également observé que l'acide urocanique est métabolisé à un degré plus élevé que l'histidine. En tenant compte du fait que la croissance n'a pas été bloquée dans le cas de cultures inhibées par l'azasérine, contrairement à ce qui a lieu avec des cultures inhibées par la sulfadiazine, nous pouvons résumer l'ensemble des résultats exposés dans les tableaux IV, IX et X ainsi :

L'histidine et l'acide urocanique ont paru être utilisés préférentiellement à la biosynthèse de l'AICA-riboside dans les cultures inhibées par la sulfadiazine. Dans celles contenant de l'azasérine, où la croissance paraît normale, l'inhibiteur doit — en bloquant la formation d'un précurseur des purines — orienter en premier lieu l'activité biologique des bactéries vers la formation des purines. Dans ces conditions l'histidine et ses métabolites doivent d'abord — et avant tout — activer la formation du précurseur des purines, indispensable à la croissance des bactéries que nous constatons ; ils peuvent ensuite servir à d'autres synthèses biologiques que celles des purines.

**B-6 : Modes d'action de l'histidine et de ses dérivés
dans des cultures d'*Escherichia coli* B, 54.125
inhibées par l'azasérine.**

Le fait que l'action antagoniste de l'histidine et de ses métabolites sur l'inhibition exercée par l'azasérine soit peu influencée par la concentration de l'inhibiteur, semble indiquer que l'azasérine ne réagit pas toujours concurremment à l'histidine et à ses métabolites. Toutefois, il est possible que ces corps possèdent une affinité plus grande que l'azasérine pour le système enzymatique responsable de la réaction : formylglycinamide-ribotide $\rightarrow$ formylglycinamidine-ribotide et qu'ils le protègent contre l'action de l'azasérine.

Nous avons étudié cet aspect du problème de l'antagonisme : histidine-azasérine, de la façon suivante. Nous avons cultivé le microorganisme sur milieu synthétique (sels et glucose) additionné de 3 γ /ml. d'azasérine et après les 11 premières heures, lorsque le développement cesse, nous avons supposé que l'azasérine a formé un complexe avec l'enzyme ; donc l'inhibition est devenue totale. Nous avons alors procédé à l'addition de solutions stériles, soit d'histidine, soit d'un de ses métabolites, soit d'un des autres composés dont nous nous sommes proposés d'étudier l'action. Les solutions de tous ces corps ont été ajoutées de telle façon que leurs concentrations soient égales à $0,75 \times 10^{-3}$ M. Les cultures ont ensuite été prolongées pendant 10 h.

Nos résultats, résumés dans le tableau IX, indiquent que, si l'inhibition par l'azasérine s'effectue vraiment par la formation d'un tel complexe : enzyme-azasérine, ce complexe n'est pas stable en présence de composés tels que l'histidine, l'acide urocanique, l'acide formamidinoglutarique et la glutamine, tandis que les acides formamidinoacétique, formylglutamique et glutamique sont à cet égard moins actifs.

Nous avons vu plus haut — (tableaux IV, IX et X) — que l'histidine et l'acide urocanique sont dans le cas de cultures inhibées par l'azasérine métabolisés plus intensément que dans des cultures sans inhibiteur. En prenant en considération l'hypothèse de la formation d'un complexe : enzyme-azasérine, et en tenant compte des résultats que nous venons d'exposer, il nous a paru intéressant d'étudier si l'histidine est métabolisée également dans le cas où elle n'est ajoutée au milieu qu'après les 11 premières heures de cultures.

Le tableau XII montre que l'histidine est toujours métabolisée — à un degré qui, par rapport à l'augmentation de la croissance, est semblable à celui que nous avons observé dans des cultures où l'histidine et l'azasérine ont été ajoutées au milieu simultanément, au moment de l'inoculation.

TABLEAU XI.

N° de l'expér.	Suppléments étudiés : (conc. finale $0,75 \times 10^{-3}$ M)	Densités bactériennes	
		après 11 h.	10 h. après pipetages
1	—	42	—
2	Eau physiologique	—	54
3	Glycine	—	53
4	Formylglycine	—	55
5	Glycinamide	—	58
6	Formylglycinamide	—	55
7	Acide formamidinoacétique	—	60
8	Histidine	—	77
9	Acide urocanique	—	72
10	Acide formamidinoglutarique	—	76
11	Acide formylglutamique	—	63
12	Acide glutamique	—	67
13	Glutamine	—	84

Des cultures d'*Escherichia coli* B, 54.125 ont été effectuées dans un milieu synthétique de sels et glucose contenant 3 γ /ml. d'azasérine. Après 11 heures de culture on a ajouté différents suppléments, dérivés de la glycine et de l'histidine, et la culture a été prolongée de 10 heures à 37° C. Les mesures de densités bactériennes ont été faite au spectrophotomètre Klett-Summerson.

Ces observations méritent d'être comparées à celles faites sur des cultures inhibées par la sulfadiazine (chap. III, A-2-a). En effet, dans ce dernier cas, où la biosynthèse du précurseur des purines, l'AICA-ribotide, n'a plus lieu, nous ne constatons pas non plus une disparition de l'histidine.

Par contre, nos derniers résultats (tableau XII) montrent que la croissance des cultures inhibées par l'azasérine reprend après que le milieu ait été supplémenté en histidine. Ce nouveau départ, qu'accompagne une utilisation du dérivé imidazolique, prouve qu'une biosynthèse de purines a lieu malgré l'inhibition du transfert de l'azote de la glutamine sur le formylglycinamide-ribotide.

Ces constatations nous amènent donc à admettre que le rapport métabolique entre l'histidine et ses dérivés d'une

TABEAU XII.

Temps de culture après addition de la solution d'histidine	Densités bactériennes après addition	Dosages Hist.	Histid. disparu en μ M/ml
0 heure	30	0,490	—
2 heures	44	0,488	0,003
4 heures	53	0,474	0,025
6 heures	58	0,461	0,046
8 heures	55	0,455	0,057

L'Escherichia coli B, 54.125 a été cultivée sur un milieu synthétique de sels et glucose contenant 3 γ /ml. d'azasérine. Après 11 heures (temps 0 heure du tableau), on a ajouté dans chaque fiole 0,5 ml. d'une solution d'histidine (concentration finale de $0,75 \times 10^{-3}$ M). Des prélèvements ont ensuite été opérés à des temps successifs.

part et les purines d'autre part, rapport qui s'est manifesté à travers toute notre expérimentation, n'est pas soumis à l'influence de l'azasérine.

B-7 : Formation d'intermédiaires au cours de l'activation de la biosynthèse des purines par l'histidine et ses métabolites.

Après avoir démontré que l'histidine et ses dérivés activent la biosynthèse des purines, nous avons essayé de mettre en évidence la formation d'intermédiaires éventuels de ce processus.

Nous avons réalisé des analyses chromatographiques sur les milieux de culture en utilisant les solvants et les méthodes de révélation déjà indiqués. Nous nous sommes cependant heurtés à des difficultés techniques importantes qui nous ont empêchés d'obtenir certains renseignements précis. En effet, pour pouvoir révéler un intermédiaire éventuel il faut, suivant la méthode de détection employée,

déposer au minimum une quantité d'environ 5-10 μg du composé sur le papier. Cependant, un tel intermédiaire — même l'AICA-riboside — se trouverait à des concentrations très faibles dans le milieu, même dans des conditions très favorables à sa formation. Aussi aurions-nous été obligés pour le déceler de déposer sur le papier chromatographique plus d'1 ml. du milieu synthétique contenant des quantités importantes de sels et glucose, — conditions très favorables à des analyses précises.

Nous avons essayé de résoudre le problème que pose la présence des sels et du glucose dans le milieu par une suite d'opérations : lyophilisation du liquide surnageant (après centrifugation de la culture), extraction du résidu lyophilisé avec un minimum d'eau (pH final 6,6-7,0), refroidissement de l'extrait pour précipiter les sels les moins solubles, et finalement chromatographie — soit directement sur papier, soit d'abord sur colonnes d'échangeurs d'ions, lyophilisation de l'éluat et enfin chromatographie sur papier.

Nous n'avons cependant pas pu mettre en évidence d'autres composés que ceux déjà connus. Même dans le cas de cultures en présence d'histidine ou d'acide urocanique, nous n'avons pas pu caractériser l'acide formamidinoglutarique, pourtant l'intermédiaire direct dans la dégradation biologique de ces dérivés imidazoliques [284].

En ce qui concerne l'identification d'intermédiaires dans la biosynthèse des purines, nous avons déjà indiqué la méthode qui nous a permis de constater la formation de l'AICA-riboside et -ribotide. Dans le cas de cultures inhibées par l'azasérine, la mise en évidence d'une accumulation du formylglycinamide-ribotide et la détermination des conditions d'une telle accumulation ont été décrites par TOMISEK et coll. [292]. Aussi avons-nous admis que ce composé s'accumule également dans nos cultures inhibées par l'azasérine, et il est évident que la transformation du formylglycinamide-ribotide en le formylglycinamidine-ribotide en présence d'histidine et de ses métabolites aurait établi définitivement que l'histidine et ses dérivés peuvent servir

de donateurs de l'azote nécessaire à cette réaction. Les traitements chimiques les plus poussés : lyophilisation, chromatographie sur colonnes, éluations fractionnées, lyophilisation des éluats et enfin chromatographie sur papier, ne nous ont pas permis d'isoler et d'identifier les ribotides du formylglycinamide et du glycinamide.

III-B. — Résumé et conclusions.

L'ensemble des résultats obtenus sur l'influence de l'histidine et de ses dérivés sur la biosynthèse des purines dans les cultures d'*Escherichia coli* B, 54.125, inhibées par l'azasérine, peut être ainsi résumé :

1°) L'histidine et ses dérivés suppriment presque totalement l'inhibition de la croissance du microorganisme due à l'azasérine. Pour que la multiplication de celui-ci s'effectue normalement, il est indispensable qu'une biosynthèse d'acides nucléiques (c'est-à-dire des purines) ait lieu ; nous sommes donc tenus d'admettre que l'histidine et ses dérivés activent la biosynthèse des purines ;

2°) La disparition de l'histidine et de l'acide urocanique, qui accompagne d'une façon parallèle et systématique l'activation de la croissance, indique qu'il existe un rapport métabolique entre ces dérivés imidazoliques — ou l'un de leurs produits de dégradation enzymatique — et les purines. En effet, les différences entre l'intensité de la disparition du dérivé imidazolique dans le cas de cultures normales et dans celui de cultures inhibées, montrent que, l'utilisation de l'histidine et de ses dérivés est augmentée dans les cas où la voie normale de biosynthèse des purines (schéma page 28) est bloqué et où la formation des purines à partir de leurs précurseurs habituels n'a pas lieu ;

3°) L'azasérine bloque la réaction entre le formylglycinamide-ribotide et la glutamine, — réaction qui aboutit normalement à la formation du ribotide de formylglycinamide. En supprimant l'inhibition par l'azasérine, l'influence

non compétitive de l'histidine et de ses dérivés sur la biosynthèse des purines se manifeste donc à un stade qui ne peut pas précéder cette réaction ;

4°) Nos résultats permettent également d'obtenir une vue d'ensemble des activités des différents dérivés de l'histidine sur la croissance d'*Escherichia coli*, inhibée par l'azasérine. Ainsi, l'activité de l'histidine et celle de l'acide urocanique sont presque identiques (légèrement supérieure pour l'histidine) tandis que celle de l'acide formamidino-glutarique, FAG, est sensiblement plus élevée. Les acides formylglutamique et glutamique sont par contre moins actifs que l'histidine.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

RÉSUMÉ GÉNÉRAL.

Avant d'entreprendre un travail d'ensemble sur l'influence de l'histidine et de ses métabolites dans la biosynthèse des purines par *Escherichia coli* B, 54.125, nous avons d'abord cherché à préciser les voies par lesquelles une telle étude était susceptible de donner des résultats nets. L'emploi de différents inhibiteurs microbiens permet de bloquer cette biosynthèse à des stades plus ou moins avancés et offre ainsi la possibilité d'étudier l'influence de l'histidine et de ses dérivés à des étapes métaboliquement bien définies. Nous avons choisi de l'étudier dans des cultures inhibées soit par la sulfadiazine, soit par l'azasérine.

I. — Conditions optima de formation du 5(4)-amino-4(5)-imidazol-carboxamide-riboside dans les cultures d'*Escherichia coli* B, 54.125.

Dans des cultures d'*Escherichia coli*, inhibées par la sulfadiazine, la biosynthèse des purines est bloquée au stade de la dernière transformylation : AICA-ribotide $\longrightarrow$ acide inosinique permettant ainsi l'accumulation du premier dans le milieu de culture. En conséquence, nous avons été amenés à étudier d'abord les conditions optima de cette accumulation.

Nos recherches ont permis de préciser que l'aérobiose est d'une importance capitale et nous avons également pu constater que les concentrations en glucose, en glycine et en inhibiteur sont déterminantes pour obtenir une formation

optima de l'AICA-riboside. Nos résultats sont en partie différents de ceux obtenus avec d'autres souches d'*Escherichia coli* B et montrent ainsi la nécessité d'un tel travail préliminaire sur chaque microorganisme qu'on se propose d'utiliser.

Nous avons également pu isoler et identifier le dérivé de l'AICA accumulé comme étant le riboside de l'AICA, et nous avons élaboré une technique détaillée pour réaliser son isolement. L'AICA-ribotide a été identifié après culture dans des conditions différentes de celles qui permettent la formation *de novo* de l'AICA-riboside.

II. — Synthèse de dérivés de l'histidine et de la glycine.

Pour pouvoir étudier l'influence de l'histidine et de ses métabolites sur la biosynthèse des purines dans *Escherichia coli*, il nous a paru indispensable de pouvoir disposer d'un certain nombre de composés, susceptibles d'intervenir ou de constituer des intermédiaires dans la réaction globale : Histidine $\longrightarrow$ acide inosinique.

Nous avons préparé un certain nombre de ces corps, par voie de synthèse organique ou biologique.

Les dérivés de la glycine, la formylglycine, la glycinamide, la formylglycinamide et l'acide formamidinoacétique (formiminoglycine, FIG) ont été préparés et leur composition contrôlée par analyses élémentaires et chromatographiques, ainsi que par leurs points de fusion.

Le produit de dégradation de l'histidine et de l'acide urocanique, l'acide formamidinoglutarique (l'acide formiminoglutamique, FAG) a été préparé à partir de l'histidine après une dégradation enzymatique par un extrait de foie de lapin. Les acides formylglutamique, imidazylacétique et imidazylpyruvique ont été synthétisés par voie organique et tous ces composés ont également donné des points de fusion et des résultats d'analyse élémentaire et chromatographique satisfaisants.

III. — Influence de l'histidine et ses métabolites sur la biosynthèse des purines dans *Escherichia coli* B, 54.125.

Nous avons réalisé cette partie de nos recherches en deux étapes, à savoir l'étude de culture d'*Escherichia coli* inhibée par la sulfadiazine et celle de cultures inhibées par l'azasérine.

A. — *Escherichia coli* B, 54.125 inhibé par la sulfadiazine.

Une expérimentation préliminaire avait montré que la biosynthèse des purines dans *Escherichia coli* inhibé par la sulfadiazine s'arrête au stade de l'AICA-ribotide ou riboside.

Nos recherches ont porté sur l'influence que pouvaient exercer l'histidine et ses métabolites sur la formation de ces dérivés de l'AICA. Les résultats ont établi que l'histidine, et plus encore l'acide urocanique, l'acide formamidinoglutarique et l'acide imidazylacétique activent la formation de l'AICA-riboside. Cette activation est égale (histidine) ou supérieure (acide urocanique et FAG) à celle observée avec la glycine que nous avons jusqu'alors considérée comme maxima. Elle est accompagnée d'une utilisation parallèle des dérivés imidazoliques plus intense pour l'acide urocanique que pour l'histidine.

Le rapport entre la formation de l'AICA-riboside et la disparition du dérivé imidazolique est constant et égal à environ 1 : 2.

Nous avons essayé de vérifier si l'histidine et ses dérivés étaient capables de servir comme donateurs de « formyle » ou de « formimino », mais nos résultats se sont révélés négatifs dans les conditions de culture adoptées.

B. — *Escherichia coli* B, 54.125, inhibé par l'azasérine.

L'inhibition de la biosynthèse des purines par l'azasérine s'effectue au stade de la réaction : formylglycinamide- ri-

botide >formylglycinamidine-ribotide, et nous savons que cette inhibition est supprimée par la glutamine qui est le donateur de l'azote pour la réaction.

L'expérimentation avec des cultures d'*Escherichia coli*, inhibées par l'azasérine et dont le milieu a été supplémenté en histidine ou en un de ses métabolites montre que ces dérivés, imidazoliques ou non, suppriment également l'inhibition due à l'azasérine. Cet effet de l'histidine et de ses métabolites s'accompagne d'une utilisation de ces derniers à un degré analogue, voire même supérieur, à celui que nous avons observé dans le cas de cultures inhibées par la sulfadiazine. L'histidine et ses dérivés antagonisent l'effet inhibiteur de l'azasérine à une concentration sensiblement la même que celle qui — dans des cultures inhibées par la sulfadiazine — permet une accumulation maxima de l'AICA-ribotide. En outre, l'antagonisme : histidine-azasérine, n'est pas compétitif.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES.

Au cours de ces dernières années, un certain nombre de travaux ont été consacrés à l'étude d'une participation éventuelle de l'histidine à la biosynthèse des purines. Nous possédons à l'heure actuelle, grâce à eux, des renseignements indiquant qu'une telle possibilité ne doit pas être écartée bien qu'il soit certain que le noyau imidazolique de l'histidine ne soit pas incorporé directement dans la molécule purique.

Plusieurs mécanismes ont été envisagés pour expliquer la participation de l'histidine à la formation *de novo* des purines. Ainsi, nous savons que l'histidine et certains de ses dérivés peuvent servir comme donateurs d'un groupement « formyle » ou « formyle actif », et que, dans ce dernier cas, le carbone n° 2 du noyau imidazolique de l'histidine est incorporé en position 2 dans le noyau pyrimidique des purines [162, 172, 191].

D'autres travaux indiquent que l'histidine peut servir de donateur du groupement « formimino » par son dérivé, l'acide formamidinoglutarique, et certains auteurs [184, 223, 243] envisagent que des transferts de « formimino » peuvent être d'une très grande importance biologique. Toutefois, à notre connaissance personne n'a étudié une telle possibilité de participation de l'histidine à la biosynthèse des purines, bien que la réaction inverse : purine (guanine)

→ histidine, semble comporter le transfert d'une unité « —C—N— » [169, 172, 191].

Les travaux de BALIS, LEVIN et LUZZATI [10] indiquent que l'histidine ne sert pas uniquement à la formation des purines par simple donation de « formyle », mais que cet acide aminé y participe d'une façon plus complexe. Ces auteurs ont obtenu des résultats montrant qu'une partie de l'azote de l'histidine est également incorporée dans la molécule purique, et ils ont établi que cet azote n'est pas l'azote α -aminé de l'histidine.

Peu de travaux ont cependant donné des indications sur le mécanisme par lequel l'histidine participerait à la biosynthèse des purines. Nous savons que l'histidine peut servir comme donateur de « formyle » pour la réaction : AICA-ribotide → acide inosinique, mais cette donation de « formyle » est — à elle seule — insuffisante pour expliquer une utilisation de l'azote du noyau de l'histidine.

BURTON [50] a signalé que l'histidine active la formation de l'adénine — et par là celle des acides déoxyribonucléiques et, bien que ce même auteur conclut que l'activation de l'histidine se situe à un stade qui précède la formation de l'AICA-ribotide, aucune indication plus précise sur le mode d'action de l'histidine n'a été donnée.



Nos résultats sont particulièrement significatifs dans le cadre de ces travaux. En effet, nous avons montré que l'histidine et ses dérivés activent d'une façon certaine la biosynthèse des purines à un stade qui précède la formation de l'AICA-ribotide ; nous n'aurions, en effet, pas pu constater une activation de cette biosynthèse dans le cas contraire.

D'autre part, nous avons mis en évidence que cette activation de la formation de l'AICA-riboside est étroitement liée à une utilisation de l'histidine (ou de l'acide urocanique) et que cette formation de l'AICA-riboside semble être fonction de l'utilisation du dérivé imidazolique. Nous trouvons, pour chaque molécule d'AICA-riboside formé, que 1,8-2,0 molécules de dérivé imidazolique sont métabolisées.

Ceci indique, en effet, qu'un rapport métabolique existe entre l'histidine et ses dérivés d'une part, et l'AICA-ribotide d'autre part, mais le mécanisme par lequel s'établit ce rapport ne se révèle pas par des expériences avec des cultures, inhibées par la sulfadiazine. Nos résultats sur l'activation générale de la formation de l'AICA-riboside par l'histidine sont cependant en accord avec ceux de BURTON [50], quoique l'hypothèse de ce même auteur, suivant laquelle l'action de l'histidine serait catalytique, paraisse très peu plausible.

L'étude des cultures inhibées par l'azasérine — tout en confirmant d'une façon définitive les résultats obtenus sur des cultures inhibées par la sulfadiazine — permet cependant d'affirmer que la participation de l'histidine et de ses dérivés à la biosynthèse des purines s'effectue à un stade qui n'est pas antérieur à la formation du ribotide de formylglycinamide. En effet, l'activation importante de la croissance d'*Escherichia coli* B, 54.125, inhibée par l'azasérine, par l'histidine et ses dérivés prouve que ces composés, imidazoliques ou non, participent à la formation *de novo* des purines, de façon à supprimer l'inhibition de la réaction :



Deux mécanismes peuvent être envisagés pour expliquer cette action de l'histidine et de ses métabolites. Le premier serait que l'histidine et ses dérivés soient dégradés en formylglycinamide ou en un des autres précurseurs des pu-

rines entre le formylglycinamide-ribotide et l'AICA-ribotide. En effet, un tel mécanisme permettrait une croissance normale malgré l'inhibition par l'azasérine et une utilisation simultanée de l'histidine et de ses dérivés. Cependant, un tel mécanisme impliquerait également l'existence d'un tout autre mode de dégradation de l'histidine que ceux, connus à l'heure actuelle, ce qui est hypothétique. Aussi n'avons-nous pas pensé pouvoir tenir compte de ce mécanisme pour expliquer la participation de l'histidine et de ses métabolites à la biosynthèse des purines.

Une autre possibilité d'interprétation s'est précisée au cours de notre expérimentation avec des cultures, inhibées par l'azasérine. La biosynthèse des purines dans ces dernières s'arrête au stade du ribotide de formylglycinamide, les intermédiaires entre ce stade et l'acide inosinique ne se forment donc pas. En conséquence, l'histidine et ses métabolites ne pourront pas, dans des cultures inhibées par l'azasérine, servir de donateurs d'un groupement quelconque au cours des étapes comprises entre le formylglycinamide-ribotide et l'acide inosinique. Aussi, pour expliquer que la présence de l'histidine ou d'un de ses métabolites supprime l'inhibition par l'azasérine, c'est-à-dire permet une biosynthèse des purines, sommes-nous amenés à conclure que l'histidine et ses métabolites sont utilisés au stade même de l'inhibition de l'azasérine, à celui de la réaction :



L'histidine et ses dérivés doivent donc — dans nos conditions de culture — pouvoir servir au transfert de l'azote nécessaire à la réaction — malgré la présence de l'azasérine. On a jusqu'à ce jour considéré cet azote comme provenant spécifiquement de la glutamine.

Une telle participation de l'azote de l'histidine et de ses métabolites à la biosynthèse des purines est en accord avec l'ensemble de nos résultats. L'influence exercée sur le processus de biosynthèse des purines par les dérivés de l'histidine, augmente de celle-ci à l'acide formamidinoglutarique, et ce dernier composé possède justement un atome

d'azote très labile, à savoir l'azote imidé correspondant à l'azote en position 1 du noyau imidazolique. Aussi sommes-nous en droit de supposer que l'histidine et l'acide urocanique participent à la biosynthèse des purines par leur produit de dégradation, l'acide formamidinoglutarique. L'efficacité élevée de l'histamine et de l'acide imidazylpyruvique trouverait également leurs explications dans le fait que ces composés peuvent être dégradés — avec l'acide imidazylacétique comme intermédiaire [282, 291] — en acide formiminoaspartique [122], composé analogue à l'acide formamidinoglutarique et contenant, comme ce dernier, un atome d'azote labile.

Ces faits nous conduisent à attribuer aux dérivés formiminés de l'histidine le rôle nouveau de donateurs d'azote, qui s'ajoute à celui, déjà connu pour ces composés, de donateurs de « formyle ». Néanmoins, les résultats obtenus avec le troisième dérivé formiminé biologiquement connu, la formiminoglycine, se sont par contre révélés négatifs, ce qui pourrait être dû à une spécificité enzymatique ou à une imperméabilité des parois cellulaires à ce composé.

Il est évident que l'emploi de corps marqués avec azote —N¹⁵ sur l'azote N-1 du noyau imidazolique de l'histidine pourrait donner l'ultime confirmation sur l'utilisation de cet atome dans la réaction :



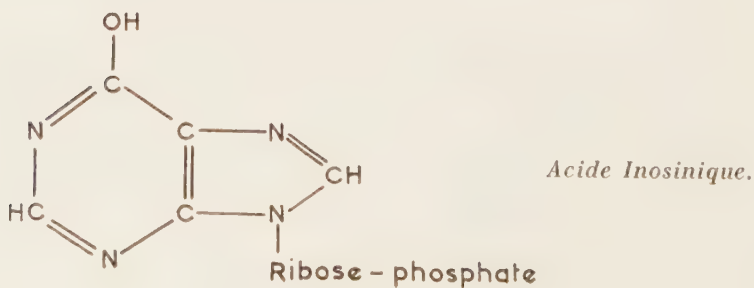
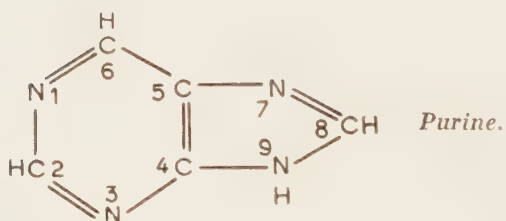
Notre expérimentation avec des cultures d'*Escherichia coli* B, 54.125, paraît cependant avoir déjà prouvé l'existence d'un tel processus dans ce microorganisme.

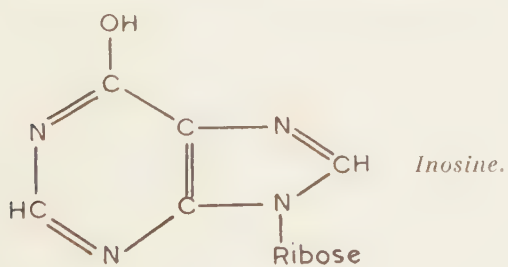
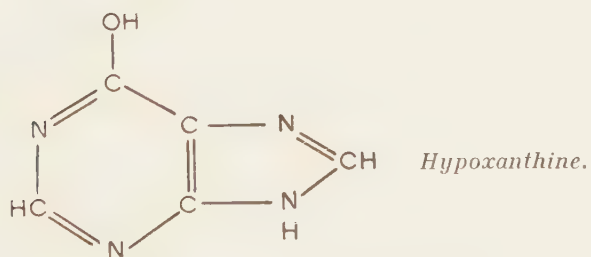
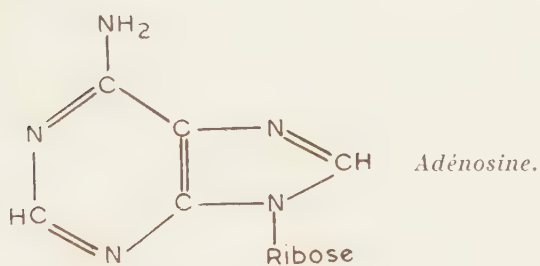
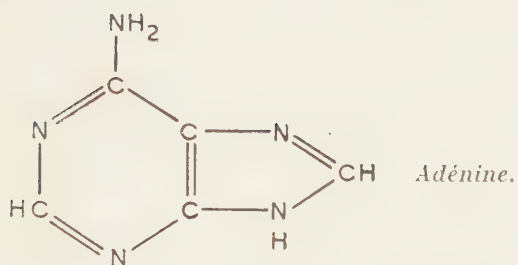
Aussi pensons-nous pouvoir admettre dès maintenant la participation de l'histidine à la biosynthèse des purines dans *Escherichia coli*. Le mécanisme de cette participation consiste non seulement en une — éventuellement deux — donation de « formyle » mais également en un transfert d'azote, inconnu jusqu'ici.

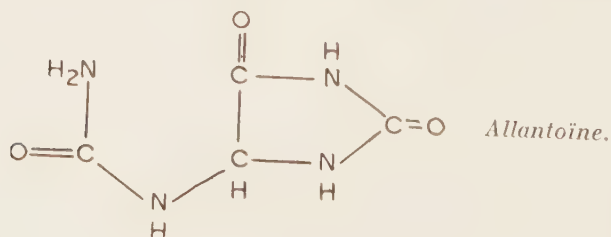
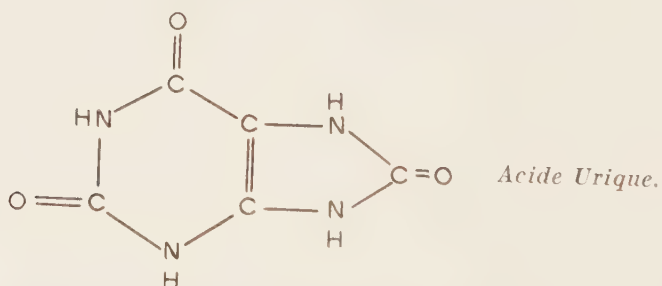
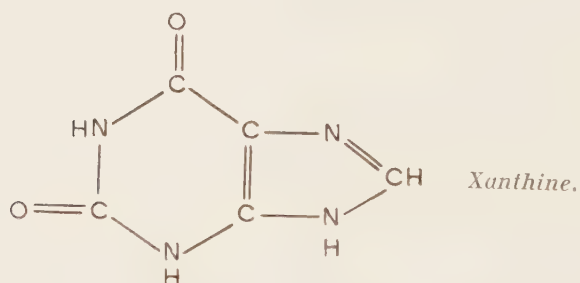
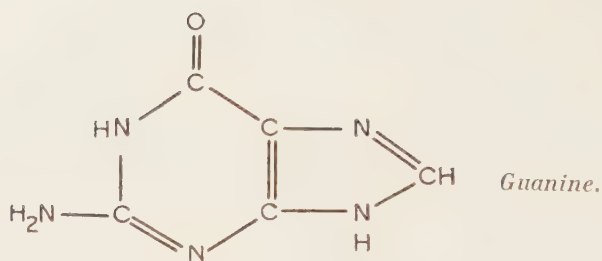
FORMULES ET ABRÉVIATIONS.

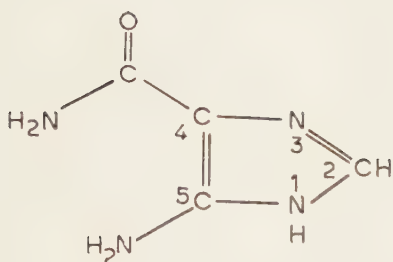
FORMULES.

- de purines,
- de quelques-uns de leurs précurseurs,
- de quelques composés jouant un rôle dans la biosynthèse des purines.

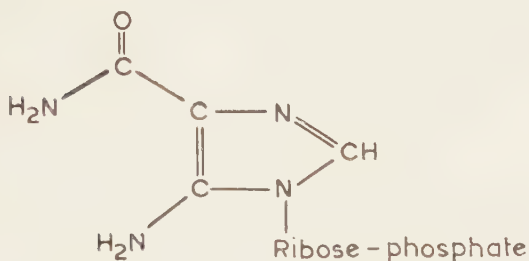




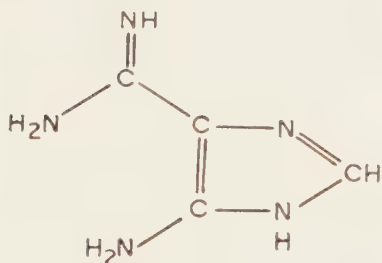




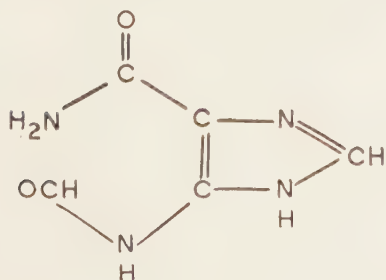
AICA
ou
5(4)-Amino-4(5)-
imidazolecarboxamide.



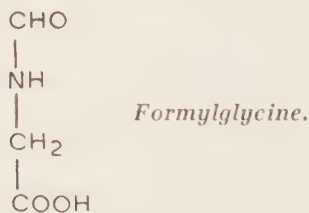
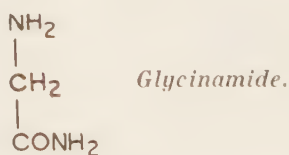
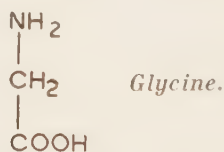
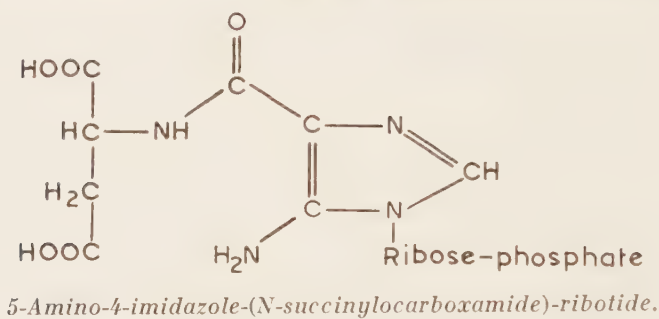
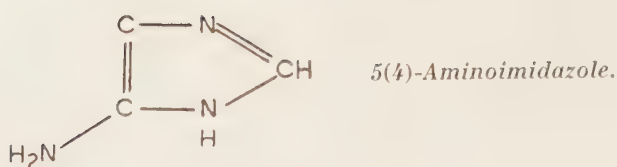
AICA-ribotide.

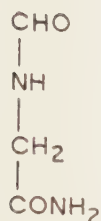


5(4)-Amino-4(5)-
imidazolecarboxamidine.

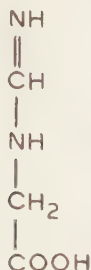


5(4)-Formamino-4(5)-
imidazolecarboxamide.

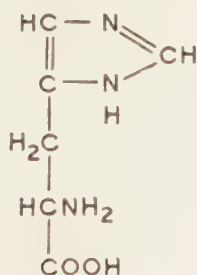




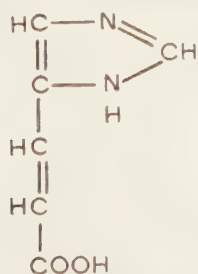
Formylglycinamide.



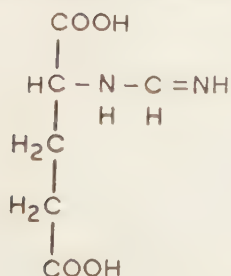
Formiminoglycine
ou
Acide Formamidinoacétique.



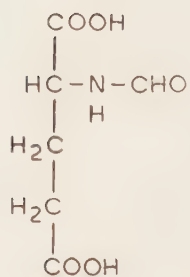
Histidine
ou
Acide α-amino-γ-imidazyl-propionique.



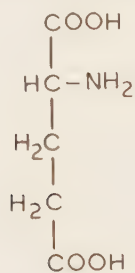
Acide Urocanique
ou
Acide Imidazyl-acrylique.



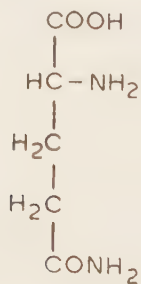
Acide Formiminoglutamique
ou
Acide Formamidinoglutarique.



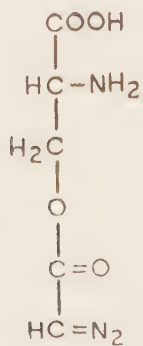
Acide Formylglutamique.



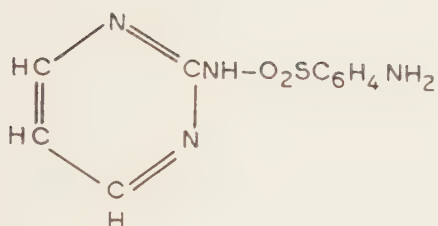
Acide Glutamique.



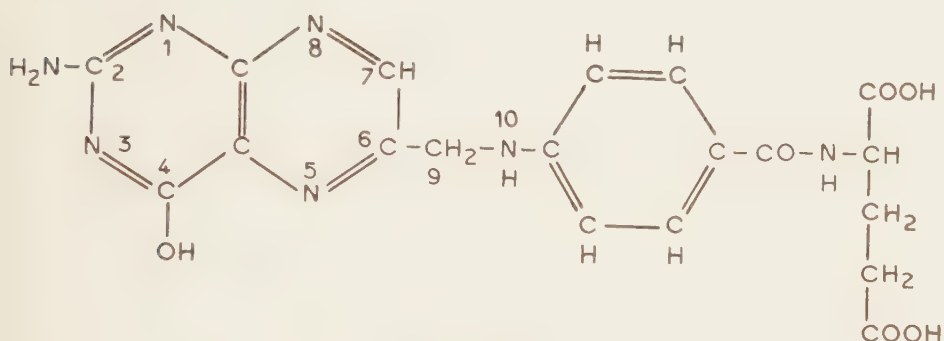
Glutamine.



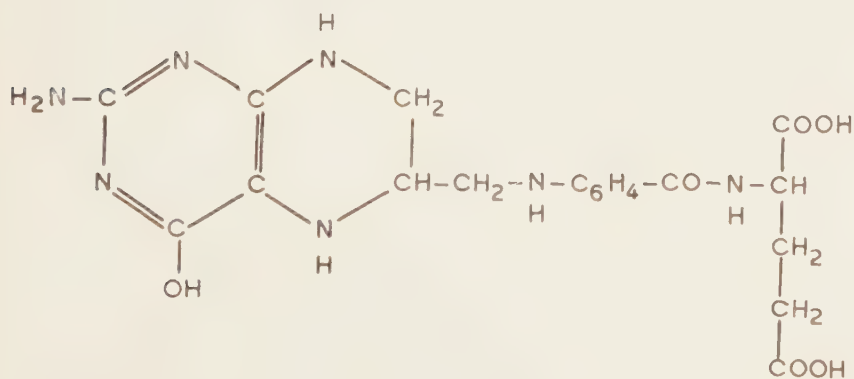
Azasérine.



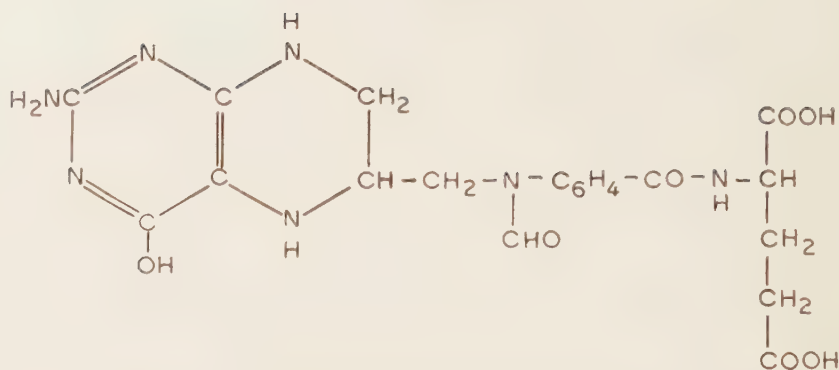
Sulfadiazine
ou
2-Amino-(sulfanilyl)-
pyrimidine.



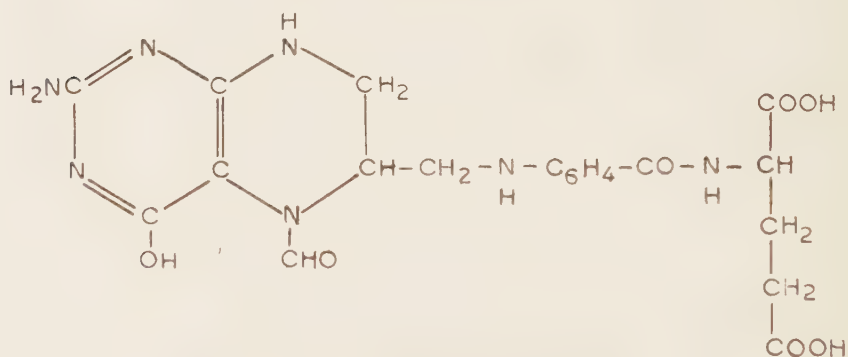
Acide Folique
ou
Acide Ptéroyle-L-glutamique.



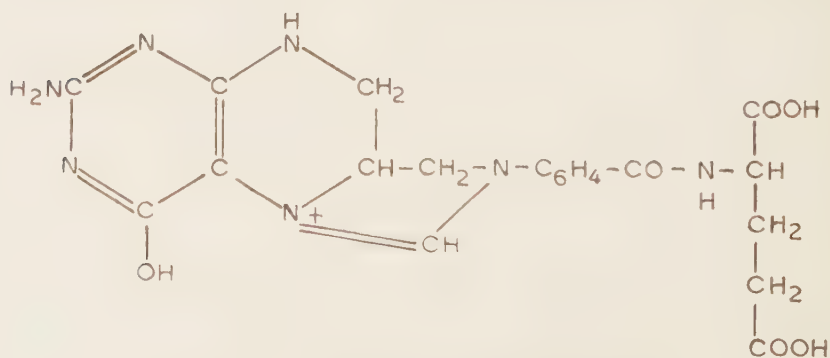
Acide Tétrahydrofolique.



Acide N¹⁰-Formyltétrahydrofolique.



Acide N⁵-Formyltétrahydrofolique
ou
Facteur Citrovorum.



Acide N⁵-N¹⁰-imidazolinium-tétrahydrofolique.

ABRÉVIATIONS

utilisées dans le texte.

ACF	: Acide N ⁵ -N ¹⁰ -imidazolinium-tétrahydrofolique, anhydroleucovorin, N ⁵ -N ¹⁰ -CHOFAH ₄ .
AICA	: 5(4)-amino-4(5)-imidazolecarboxamide.
AMP	: Adénosine-monophosphate.
ADP	: Adénosine-diphosphate.
ATP	: Adénosine-triphosphate.
CF	: Facteur Citrovorum, acide N ⁵ -formyltétrahydrofolique, N ⁵ -CHOFAH ₄ .
DNA	: Acide déoxyribonucléique.
DPN	: Diphosphopyridine nucléotide.
DPNH	: Diphosphopyridine nucléotide, réduit.
EDTA	: Acide éthylènediaminetétraacétique.
FA	: Acide folique.
FAH ₂	: Acide dihydrofolique.
FAH ₄	: Acide tétrahydrofolique.
FAG	: Acide formamidinoglutarique, acide formimino-glutamique.
FGA	: Formylglycinamide.
FIG	: Acide formamidinoacétique, formiminoglycine.
N ¹⁰ -CHOFAH ₄	: Acide N ¹⁰ -formyltétrahydrofolique.
N ¹⁰ -CHOFAH ₂	: Acide N ¹⁰ -formyldihydrofolique.
N ¹⁰ -CHOFA	: Acide N ¹⁰ -formylfolique.
N ¹⁰ -CH ₂ OHFA	: Acide N ¹⁰ -hydroxyméthylfolique.
N ¹⁰ -CH ₂ OHFAH ₄	: Acide N ¹⁰ -hydroxyméthyltétrahydrofolique.
N ⁵ -CHOFAH ₄	: Acide N ⁵ -formyltétrahydrofolique, facteur citrovorum, leucovorin, CF.
N ⁵ -N ¹⁰ -CHOFAH ₄	: Acide N ⁵ -N ¹⁰ -imidazolinium-tétrahydrofolique, anhydroleucovorin, ACF.
N ¹⁰ -CHNH-FAH ₄	: Acide N ¹⁰ -formimino-tétrahydrofolique.
N ⁵ -CHNH-FAH ₄	: Acide N ⁵ -formimino-tétrahydrofolique.
PABA	: Acide para-aminobenzoïque.
P	: Phosphate minéral.
P-O-P	: Pyrophosphate.
PRA	: 5-Phosphoribosylamine.
PRPP	: 5-Phosphoribosylpyrophosphate.
TPN	: Triphosphopyridine nucléotide.
TPNH	: Triphosphopyridine nucléotide, réduit.

BIBLIOGRAPHIE.

1. AARONSON (S.). — *J. Gen. Microbiol.*, **12**, 147 (1955).
2. AARONSON (S.) et NATHAN (H.). — *Biochim. Biophys. Acta*, **15**, 306 (1954).
3. ACKROYD (H.) et HOPKINS (F. G.). — *Biochem. J.*, **10**, 551 (1916).
4. ALIMCHANDANI (H. R.) et SREENIVASAN (A.). — *Biochim. Biophys. Acta*, **18**, 567 (1955).
5. ALIMCHANDANI (H. R.) et SREENIVASAN (A.). — *Nature*, **176**, 702 (1955).
6. ALIMCHANDANI (H. R.) et SREENIVASAN (A.) — *J. Bacteriol.*, **73**, 538 (1957).
7. ARNSTEIN (H. R. V.). — *Biochem. Soc. Symposia*, **13**, 92 (1955).
8. ARNSTEIN (H. R. V.) et NEUBERGER (A.). — *Biochem. J.*, **45**, iii (1949).
9. BALIS (M. E.), BROOKE (M. S.), BROWN (G. B.) et MAGASANIK (B.). — *J. Biol. Chem.*, **219**, 917 (1956).
10. BALIS (M. E.), LEVIN (D. H.) et LUZZATI (D.). — *J. Biol. Chem.*, **216**, 9 (1955).
11. BALIS (M. E.), PRAAG (V. D.) et BROWN (G. B.). — *Cancer Research*, **15**, 673 (1955).
12. BARKER (S. A.), BASSHAM (J. A.), CALVIN (M.) et QUARCK (U. C.). — *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 4632 (1956).
13. BARNES (F. W. jr.) et SCHOENHEIMER (R.). — *J. Biol. Chem.*, **151**, 123 (1943).
14. BEILSTEIN'S. — *Handbuch der Organischen Chemie*, **4**, 343, et II, 468.
15. BEILSTEIN'S. — *Handbuch der Organischen Chemie*, **4**, 354, et II, 789.
16. BEN-ISHAI (R.), BERGMANN (E. D.) et VOLCANI (B.). — *Nature*, **168**, 1124 (1951).
17. BEN-ISHAI (R.), VOLCANI (B.) et BERGMANN (E. D.). — *Arch. Biochem. Biophys.*, **32**, 229 (1951).
18. BEN-ISHAI (R.), VOLCANI (B.) et BERGMANN (E. D.). — *Experientia*, **7**, 63 (1951).
19. BENNETT (L. L. jr.), SCHABEL (F. M. jr.) et SKIPPER (H. E.). — *Arch. Biochem. Biophys.*, **64**, 423 (1956).
20. BENNETT (L. L. jr.), SKIPPER (H. E), TOOLAN (H. W.) et RHOADS (C. P.). — *Cancer Research*, **16**, 262 (1956).
21. BERG (P.). — *J. Biol. Chem.*, **205**, 145 (1953).
22. BERGEIL (P.). — *Z. Physiol. Chem.*, **64**, 354 (1910).
23. BERGMANN (E. D.), BEN-ISHAI (R.) et VOLCANI (B.). — *J. Biol. Chem.*, **194**, 531 (1952).
24. BERGMANN (E. D.), VOLCANI (B.) et BEN-ISHAI (R.). — *J. Biol. Chem.*, **194**, 520 (1952).
25. BLAKLEY (R. L.). — *Nature*, **173**, 729 (1954).
26. BLAKLEY (R. L.). — *Biochem. J.*, **58**, 448 (1954).
27. BLAKLEY (R. L.). — *Biochim. Biophys. Acta*, **23**, 654 (1957).

28. BLAKLEY (R. L.). — *Biochem. J.*, **65**, 331 (1957).
29. BLAKLEY (R. L.). — *Biochem. J.*, **65**, 342 (1957).
30. BLOCH (K.). — *J. Biol. Chem.*, **165**, 469 (1946).
31. BLOCH (K.). — *J. Biol. Chem.*, **165**, 477 (1946).
32. BLOCH (K.) et SCHOENHEIMER (R.). — *J. Biol. Chem.*, **138**, 167 (1941).
33. BLOCK (R. J.) et BOLLING (D.). — *The Amino Acid Composition of Proteins and Foods*, p. 445. (C. C. Thomas, publ., Springfield, Ill.), 2^e édition, 1951).
34. BOLL (W. G.). — *Plant. Physiol.*, **30**, 161 (1955).
35. BOREK (B. A.) et WAELSCH (H.). — *J. Biol. Chem.*, **205**, 459 (1953).
36. BOUTHILLIER (L. P.) et GOLDNER (M.). — *Arch. Biochem.*, **44**, 251 (1953).
37. BRATTON (A. C.) et MARSHALL (E.). — *J. Biol. Chem.*, **128**, 537 (1939).
38. BROQUIST (H. P.). — *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 6205 (1956).
39. BROWN (G. B.). — 3^e Congrès Intern. Biochimie (Bruxelles, 1955). Résumés des Communications, p. 61.
40. BUCHANAN (J. M.). — *Inf. Dis.*, **23**, 110 (1918). D'après STEPHENSON (M.) : *Bacterial Metabolism*, p. 214. (Longmans, Green and Co., London, 2^e édition, 1939).
41. BUCHANAN (J. M.). — *J. Cellular Comp. Physiol.*, **38**, suppl. 1, 143 (1951).
42. BUCHANAN (J. M.). — *Texas Repts. Biol. and Med.*, **15**, 148 (1957).
43. BUCHANAN (J. M.). — Ciba Foundation Symposium on Amino Acids and Peptides with Antimetabolic Activity, p. 75. (J. et A. Churchill Ltd London 1958).
44. BUCHANAN (J. M.), FLAKS (J. G.), HARTMAN (S. C.), LEVENBERG (B.), LUKENS (L. N.) et WARREN (L.). — Ciba Foundation Symposium on the Chemistry and Biology of Purines, p. 233. (J. et A. Churchill Ltd London 1957).
45. BUCHANAN (J. M.), LEVENBERG (B.), MELNICK (J.) et HARTMAN (S. C.). — Henry Ford Hospital Intern. Symposium 1956, p. 523. (Academic Press, N. Y. (1957).
46. BUCHANAN (J. M.) et SCHULMAN (M. P.). — *J. Biol. Chem.*, **202**, 241 (1953).
47. BUCHANAN (J. M.) et SONNE (J. C.). — *J. Biol. Chem.*, **166**, 781 (1946).
48. BUCHANAN (J. M.), SONNE (J. C.) et DELLUVA (A. M.). — *J. Biol. Chem.*, **173**, 81 (1948).
49. BURCHENAL (J. H.). — *Am. J. Clin. Nutrition*, **3**, 311 (1955).
50. BURTON (K.). — *Biochem. J.*, **66**, 48 P (1957).
51. CAMPBELL (L. K.). — *Ann. Rev. Tuberc.*, **11**, 458 (1925).
52. CARTER (C. E.). — *Ann. Rev. Biochem.*, **25**, 123 (1956).
53. CAVALIERI (L. F.), TINKER (J. F.) et BENDICH (A.). — *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 533 (1949).
54. CHAMBERLAIN (N.) et RAINBOW (C.). — *J. Gen. Microbiol.*, **11**, 180 (1954).
55. COLLIER (H. O.) et HUSKINSON (P. L.). — Ciba Foundation Symposium on the Chemistry and Biology of Purines, p. 146. (J. et A. Churchill Ltd., London, 1957).
56. CONZELMAN (G. M. jr.), MANDEL (H. G.) et SMITH (P. K.). — *Federation Proc.*, **11**, 199 (1952).
57. CONZELMAN (G. M. jr.), MANDEL (H. G.) et SMITH (P. K.). — *J. Biol. Chem.*, **201**, 329 (1953).

58. CORNFORTH (J. W.) et CORNFORTH (R. H.). — *J. Chem. Soc.* (London), **1947**, 96 (1947).
59. CUCKLER (A. C.), FROST (B. M.), McCLELLAND (L.) et SOLOTOVSKY (M.). — *Antibiotics and Chemotherapy*, **5**, 191 (1955).
60. CUTTS (N. S.) et RAINBOW (C.). — *J. Gen. Microbiol.*, **5**, 860 (1951).
61. D'IORIO (A.) et BOUTHILLIER (L. P.). — *Rev. can. biol.*, **9**, 310 (1950).
62. DOCTOR (V. M.), PATTON (T. L.) et AWAPARA (J.). — *Arch. Biochem. Biophys.*, **67**, 404 (1957).
63. DRURY (H. F.). — *Arch. Biochem.*, **19**, 455 (1948).
64. EDLBACHER (S.), BAUR (H.) et STACHELIN (H. R.). — *Z. Physiol. Chem.*, **270**, 158 (1941).
65. EDMONDS (M. P.), DELLUVA (A. M.) et WILSON (D. W.). — *Federation Proc.*, **9**, 167 (1950).
66. EDMONDS (M. P.) et LE PAGE (C. A.). — *Cancer Research*, **15**, 93 (1955).
67. EHRlich (J.), ANDERSON (L.), COFFEY (G. L.), HILLEGAS (A. B.), KNUDSEN (M. P.), KOEPESELL (H. J.), KOHBERGER (D. L.) et OYAAS (J. E.). — *Nature*, **173**, 72 (1954).
68. ELWYN (D.) et SPRINSON (D. B.). — *J. Biol. Chem.*, **207**, 467 (1954).
69. FATTERPAKER (P.), MARFATIA (U.) et SREENIVASAN (A.). — *Indian J. Med. Research*, **43**, 337 (1955).
70. FEINBERG (R. H.) et GREENBERG (D. M.). — *Nature*, **181**, 897 (1958).
71. FERNANDES (J. F.), LE PAGE (G. A.) et LINDNER (A.). — *Cancer Research*, **16**, 154 (1956).
72. FISCHER (E.) et WARBURG (O.). — *Ber. Chem. Ges.*, **38**, 3997 (1905).
73. FLAKS (J. G.) et BUCHANAN (J. M.). — *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 2275 (1954).
74. FLAKS (J. G.), ERWIN (M. J.) et BUCHANAN (J. M.). — *J. Biol. Chem.*, **228**, 201 (1957).
75. FLAKS (J. G.), ERWIN (M. J.) et BUCHANAN (J. M.). — *J. Biol. Chem.*, **229**, 603 (1957).
76. FLAKS (J. G.), WARREN (L.) et BUCHANAN (J. M.). — *J. Biol. Chem.*, **228**, 215 (1957).
77. FOX (C. L.). — *Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med.*, **51**, 102 (1942).
78. FRETER (K.), RABINOWITZ (J. C.) et WITKOP (B.). — *Ann.*, **607**, 174 (1957).
79. FRIEDMAN (M. H.). — *J. Clin. Invest.*, **26**, 815 (1947).
80. FRIEDMAN (M. H.). — *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **130**, 159 (1957).
81. FRIES (N.), BERGSTROM (S.) et ROTTENBERG (M.). — *Physiol. Plant.*, **2**, 210 (1949).
82. FRUTON (J. S.) et SIMMONS (S.). — *General Biochemistry*, p. 478 et p. 682. (John Wiley and Sons, London, 1953).
83. FRY (B. A.). — 3^e Congrès Intern. Biochimie, Bruxelles 1955. Résumés des Communications, p. 90.
84. FUSARI (S. A.), FROHARDT (R. P.), RYDER (A.), HASKELL (T. H.), JOHANNESSEN (D. W.), ELDER (C. C.) et BARTZ (Q. R.). — *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 2878 (1954).
85. FUSARI (S. A.), HASKELL (T. H.), FROHARDT (R. P.) et BARTZ (Q. R.). — *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 2881 (1954).
86. GOLDTHWAIT (D. A.). — *J. Biol. Chem.*, **222**, 1051 (1956).
87. GOLDTHWAIT (D. A.) et PEABODY (R. A.). — *Federation Proc.*, **13**, 218 (1954).

88. GOLDTHWAIT (D. A.), PEABODY (R. A.) et GREENBERG (G. R.). — *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 5258 (1954).
89. GOLDTHWAIT (D. A.), PEABODY (R. A.) et GREENBERG (G. R.) dans McELROY (W. D.) et GLASS (H. B.). — *Symposium on Amino Acid Metabolism*, p. 765. (The Johns Hopkins Press, Baltimore, U.S.A., 1955).
90. GOLDTHWAIT (D. A.), PEABODY (R. A.) et GREENBERG (G. R.). — *J. Biol. Chem.*, **221**, 555 (1956).
91. GOLDTHWAIT (D. A.), PEABODY (R. A.) et GREENBERG (G. R.). — *J. Biol. Chem.*, **221**, 569 (1956).
92. GOTS (J. S.). — *Federation Proc.*, **9**, 178 (1950).
93. GOTS (J. S.). — *Nature*, **172**, 256 (1953).
94. GOTS (J. S.). — *Federation Proc.*, **14**, 220 (1955).
95. GOTS (J. S.). — *J. Biol. Chem.*, **223**, 57 (1957).
96. GOTS (J. S.), BIRD (T. J.) et MUDD (S.). — *Biochim. Biophys. Acta*, **17**, 449 (1955).
97. GOTS (J. S.) et CHU (E. C.). — *J. Bacteriol.*, **64**, 537 (1952).
98. GOTS (J. S.) et GOLLUB (E. G.). — *J. Bacteriol.*, **72**, 858 (1956).
99. GOTS (J. S.) et LOVE (S. H.). — *J. Biol. Chem.*, **210**, 395 (1954).
100. GREENBERG (G. R.). — *Federation Proc.*, **9**, 179 (1950).
101. GREENBERG (G. R.). — *Federation Proc.*, **10**, 192 (1951).
102. GREENBERG (G. R.). — *J. Biol. Chem.*, **190**, 611 (1951).
103. GREENBERG (G. R.). — *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 6307 (1952).
104. GREENBERG (G. R.). — *Federation Proc.*, **12**, 211 (1953).
105. GREENBERG (G. R.). — *Federation Proc.*, **12**, 651 (1953).
106. GREENBERG (G. R.). — *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 1458 (1954).
107. GREENBERG (G. R.). — *Federation Proc.*, **13**, 745 (1955).
108. GREENBERG (G. R.). — *J. Biol. Chem.*, **219**, 423 (1956).
109. GREENBERG (G. R.) et JAENICKE (L.). — 3^e Congrès Intern. Biochimie, Bruxelles 1955. Résumés des Communications, p. 49.
110. GREENBERG (G. R.) et JAENICKE (L.). — *Giba Foundation Symposium on the Chemistry and Biology of Purines*, p. 204. (J. et A. Churchill Ltd., London, 1957).
111. GREENBERG (G. R.), JAENICKE (L.) et SILVERMAN (M.). — *Biochim. Biophys. Acta*, **17**, 589 (1955).
112. GREENBERG (G. R.) et SPILMAN (E. L.). — *J. Biol. Chem.*, **219**, 411 (1956).
113. GREENLESS (J.) et LE PAGE (G. A.). — *Cancer Research*, **16**, 808 (1956).
114. GYÖRGY (P.) et THANNHAUSER (S. J.). — *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **180**, 286 (1929).
115. HAMILL (R. L.), HERMANN (R. L.), BYERRUM (R. U.) et FAIRLEY (J. L.). — *Biochim. Biophys. Acta*, **21**, 394 (1956).
116. HANES (C. S.) et ISHERWOOD (F. A.). — *Nature*, **164**, 1107 (1949).
117. HARRIS (D. A.), RUGER (M.), REAGAN (M. A.), WOLF, (F. J.), PECK (R. L.), WALLICK (H.) et WOODRUFF (H. B.). — *Antibiotics and Chemotherapy*, **5**, 183 (1955).
118. HARTMAN (S. C.), LEVENBERG (B.) et BUCHANAN (J. M.). — *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 501 (1955).
119. HARTMAN (S. C.), LEVENBERG (B.) et BUCHANAN (J. M.). — *J. Biol. Chem.*, **221**, 1057 (1956).
120. HAYAISHI (O.). — Dans McELROY (W. D.) et GLASS (H. B.) : *Symposium on Amino Acid Metabolism*, p. 391. (The Johns Hopkins Press, Baltimore, U.S.A., 1955).
121. HAYAISHI (O.), TABOR (H.) et HAYAISHI (T.). — *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 5570 (1954).

122. HAYAISHI (O.), TABOR (H.) et HAYAISHI (T.). — *J. Biol. Chem.*, **227**, 161 (1957).
123. HEDGECOCK (L. W.). — *J. Bacteriol.*, **72**, 839 (1956).
124. HERMANN (R. L.), FAIRLEY (J. L.) et BYERRUM (R. U.). — *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 1902 (1955).
125. HITCHINGS (G. H.). — *Am. J. Clin. Nutrition*, **3**, 321 (1955).
126. HORROCKS (R. H.). — *Nature*, **164**, 444 (1949).
127. HULTIN (T.). — *Arkiv. Kemi.*, **5**, 267 (1953).
128. ISHII (K.) et SEVAG (M. G.). — *Antibiotics and Chemotherapy*, **6**, 500 (1956).
129. JAENICKE (L.). — *Biochim. Biophys. Acta*, **17**, 588 (1955).
130. JAENICKE (L.). — *Federation Proc.*, **15**, 281 (1956).
131. KALCKAR (H.). — *J. Biol. Chem.*, **167**, 461 (1947).
132. KAPPELLER (A.) et FLETCHER (M.). — 4^e Congrès Intern. Biochimie, Vienne (Autriche) 1958. Résumés des Communications, p. 60.
133. KAPLAN (L.) et STOCK (C. C.). — *Federation Proc.*, **13**, 239 (1954).
134. KARJALA (S. A.). — *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 504 (1955).
135. KARLSSON (J. L.) et BARKER (H. A.). — *J. Biol. Chem.*, **177**, 597 (1949).
136. KATSUNUMA (N.). — 4^e Congrès Intern. Biochimie, Vienne (Autriche) 1958. Résumés des Communications, p. 189.
137. KATSUNUMA (N.), ISHIKAWA (E.) et WATARAI (K.). — *Kekkaku*, **30**, 538 (1955).
138. KATSUNUMA (N.), ISHIKAWA (E.) et WATARAI (K.). — *Kekkaku*, **30**, 591 (1955).
139. KATSUNUMA (N.), SHODA (T.) et NODA (H.). — *J. Vitaminol. (Osaka)*, **3**, 77, (1957).
140. KELLER (C.) et LANG (K.). — *Biochem. Z.*, **328**, 285 (1956).
141. KIRSANOVA (V. A.) et VODOLAZSKAYA (N. A.). — *Voprosy Onkologii*, **2**, 329 (1956).
142. KISLIUK (R. L.) et SAKAMI (W.). — *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 1456 (1954).
143. KISLIUK (R. L.) et SAKAMI (W.). — *J. Biol. Chem.*, **214**, 47 (1955).
144. KISLIUK (R. L.), SAKAMI (W.) et PATWARDHAN (M. V.). — *J. Biol. Chem.*, **221**, 885 (1956).
145. KLEIN (D. T.) et KLEIN (R. M.). — *Plant. Physiol.*, **30**, 410 (1955).
146. KNUDSON (A. G. jr.). — *Nature*, **176**, 830 (1955).
147. KORN (E. D.) et BUCHANAN (J. M.). — *J. Biol. Chem.*, **217**, 183 (1955).
148. KORN (E. D.), CHARALAMPOUS (F. C.) et BUCHANAN (J. M.). — *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 3610 (1953).
149. KORNBERG (A.), LIEBERMAN (I.) et SIMMS (E. S.). — *J. Biol. Chem.*, **215**, 389 (1955).
150. KORNBERG (A.), LIEBERMAN (I.) et SIMMS (E. S.). — *J. Biol. Chem.*, **215**, 417 (1955).
151. KRAML (M.) et BOUTHILLIER (L. P.). — *Can. J. Biochem. and Physiol.*, **33**, 590 (1955).
152. KRAML (M.) et BOUTHILLIER (L. P.). — *Can. J. Biochem. and Physiol.*, **34**, 783 (1956).
153. KRITSKII (G. A.). — *Biokhimiya*, **20**, 158 (1955).
154. KRITSKII (G. A.) et MYAGKAYA (G. L.). — *Biokhimiya*, **21**, 694 (1956).

155. KRITSKII (G. A.) et MYAGKAYA (G. L.). — *Doklady Akad. Nauk., S.S.S.R.*, **111**, 398 (1956).
156. KRITSKII (G. A.) et STRUCHKOV (V. A.). — *Biokhimiya*, **21**, 196 (1956).
157. LEVENBERG (B.) et BUCHANAN (J. M.). — *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 504 (1956).
158. LEVENBERG (B.) et BUCHANAN (J. M.). — *J. Biol. Chem.*, **224**, 1005 (1957).
159. LEVENBERG (B.) et BUCHANAN (J. M.). — *J. Biol. Chem.*, **224**, 1019 (1957).
160. LEVENBERG (B.), HARTMAN (S. C.) et BUCHANAN (J. M.). — *J. Biol. Chem.*, **220**, 379 (1956).
161. LEVENBERG (B.), MELNICK (I.) et BUCHANAN (J. M.). — *J. Biol. Chem.*, **225**, 163 (1957).
162. LEWIS (H. B.) et DOISY (E. A.). — *J. Biol. Chem.*, **36**, 9 (1918).
163. LOVE (S. H.). — *J. Bacteriol.*, **72**, 628 (1956).
164. LOVE (S. H.) et GOTS (J. S.). — *J. Biol. Chem.*, **212**, 647 (1955).
165. LOWY (B. A.), KING (M.) et LONDON (J. M.). — 4^e Congrès Intern. Biochimie, Vienne (Autriche) 1958. Résumés des Communications, p. 157.
166. LUKENS (L. N.) et BUCHANAN (J. M.). — *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 1511 (1957).
167. MCCARTHY (D. A.), BAYLES (A.) et THOMPSON (P. E.). — *J. Parasitol.*, **43**, 283 (1957).
168. McDONALD (M. W.). — *Nature*, **177**, 343 (1956).
169. MAGASANIK (B.). — *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 5449 (1956).
170. MAGASANIK (B.) et BOWSER (H.). — *J. Biol. Chem.*, **213**, 571 (1955).
171. MAGASANIK (B.) et BOWSER (H.). — Dans McElroy (W. D.) et Glass (H. B.) : Symposium on Amino Acid Metabolism, p. 398. (The Johns Hopkins Press, Baltimore, U.S.A., 1955).
172. MAGASANIK (B.), MOYED (H. S.) et KARIBIAN (D.). — *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 1510 (1956).
173. MANDEL (H. G.). — *J. Biol. Chem.*, **225**, 137 (1957).
174. MANDEL (H. G.), SUGARMAN (G. I.) et APTER (R. A.). — *J. Biol. Chem.*, **225**, 151 (1957).
175. MANDEL (H. G.), WAY (J. L.) et SMITH (P. K.). — *Biochim. Biophys. Acta*, **23**, 402 (1957).
176. MATSUDA (M.) et MAKINO (K.). — *Nature*, **179**, 315 (1957).
177. MEHLER (A. H.), TABOR (H.) et BAUER (H.). — *J. Biol. Chem.*, **197**, 475 (1952).
178. MEISTER (A.) et TICE (S. V.). — *J. Biol. Chem.*, **187**, 173 (1950).
179. MELNICK (I.) et BUCHANAN (J. M.). — *J. Biol. Chem.*, **225**, 157 (1957).
180. MICHEEL (F.) et FLITSCH (W.). — *Liebig's Ann. der Chemie*, **577**, 234 (1952).
181. MICHEEL (F.), KRAEMINSKI (Z.), HIMMELMANN (W.) et KÜHLKAMP (A.). — *Ann.* **575**, 90 (1952).
182. MILLER (A.) et WAELSCH (H.). — *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 6195 (1954).
183. MILLER (A.) et WAELSCH (H.). — *Biochim. Biophys. Acta*, **17**, 278 (1955).
184. MILLER (A.) et WAELSCH (H.). — *Arch. Biochem. Biophys.*, **63**, 263 (1956).
185. MILLER (A.) et WAELSCH (H.). — *J. Biol. Chem.*, **228**, 365 (1957).
186. MILLER (A.) et WAELSCH (H.). — *J. Biol. Chem.*, **228**, 383 (1957).
187. MILLER (A.) et WAELSCH (H.). — *J. Biol. Chem.*, **228**, 397 (1957).

188. MILLER (R. W.), LUKENS (L. N.) et BUCHANAN (J. M.). — *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 1513 (1957).
189. MILLER (Z.), McINTOSH (N.) et HANNUM (M.). — *J. Biol. Chem.*, **225**, 715 (1957).
190. MILLER (Z.), WARREN (L.) et McINTOSH (N.). — *J. Biol. Chem.*, **205**, 331 (1953).
191. MITOMA (C.) et SNELL (E. E.). — *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **41**, 891 (1955).
192. MIURA (Y.) et NOGUCHI (T.). — *Bull. Soc. chim. biol.*, **38**, 1435 (1956).
193. MOAT (A. G.), WILKINS (C. N. jr.), et FRIEDMAN (H.). — *J. Biol. Chem.*, **223**, 985 (1956).
194. MOLHO (D.) et MOLHO-LACROIX (L.). — *Bull. Soc. chim. belges*, **65**, 153 (1956).
195. MÖLLER (E. F.), WEYGAND (F.) et WACKER (A.). — *Z. Naturforsch.*, **5b**, 18 (1950).
196. MOORE (J. A.), DICE (J. R.), NICOLAIDES (E. D.), WESTLAND (R. D.) et WITTLE (E. L.). — *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 2884 (1954).
197. MURPHY (M. L.) et KARNOFSKY (D. A.). — *Cancer*, **9**, 955 (1956).
198. NAKAMURA (M.). — *Nature*, **178**, 1119 (1956).
199. NAKAMURA (M.). — *Can. J. Microbiol.*, **3**, 501 (1957).
200. NAKAMURA (M.) et JONSSON (S.). — *Arch. Biochem. Biophys.*, **66**, 183 (1957).
201. NEIDLE (A.) et WAELSCH (H.). — *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 1767 (1956).
202. NEUBERG (C.). — *Biochem. Z.*, **56**, 500 (1913).
203. NICHOL (C. A.). — Henry Ford Hospital Intern. Symposium 1956, p. 583. (Academic Press, New-York, 1957).
204. NICKERSON (W. J.) et WEBB (M.). — *J. Bacteriol.*, **71**, 129 (1956).
205. NICOLAIDES (E. D.), WESTLAND (R. D.) et WITTLE (E. L.). — *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 2887 (1954).
206. NOGUCHI (T.). — *Pharm. Bull. (Japan)*, **4**, 92, (1956).
207. NOGUCHI (T.). — *Pharm. Bull. (Japan)*, **4**, 97 (1956).
208. NOGUCHI (T.). — *Pharm. Bull. (Japan)*, **4**, 101 (1956).
209. NOGUCHI (T.) et MIURA (Y.). — *J. Biol. Chem.*, **223**, 635 (1956).
210. OHMURA (E.) et HAYAISHI (O.). — *J. Biol. Chem.*, **227**, 181 (1957).
211. PASSONNEAU (J. V.) et TROTTER (J. R.). — *Radiation Research*, **3**, 304 (1955).
212. PEABODY (R. A.). — *Federation Proc.*, **12**, 254 (1953).
213. PEABODY (R. A.), GOLDTHWAIT (D. A.) et GREENBERG (G. R.). — *J. Biol. Chem.*, **221**, 1071 (1956).
214. PETERS (J. M.) et GREENBERG (D. M.). — *J. Biol. Chem.*, **226**, 329 (1957).
215. PLENTL (A. A.) et SCHOENHEIMER (R.). — *J. Biol. Chem.*, **153**, 203 (1944).
216. PYMAN (F. L.). — *J. Chem. Soc.*, **99**, 668 (1911).
217. RABINOWITZ (J. C.). — *J. Biol. Chem.*, **218**, 175 (1956).
218. RABINOWITZ (J. C.). — 4^e Congrès Intern. Biochimie, Vienne (Autriche) 1958. Résumés des Communications, p. 54.
219. RABINOWITZ (J. C.) et BARKER (H. A.). — *J. Biol. Chem.*, **218**, 147 (1956).
220. RABINOWITZ (J. C.) et BARKER (H. A.). — *J. Biol. Chem.*, **218**, 161 (1956).

221. RABINOWITZ (J. C.) et PRICER (W. E. jr.). — *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 1513 (1956).
222. RABINOWITZ (J. C.) et PRICER (W. E. jr.). — *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 4176 (1956).
223. RABINOWITZ (J. C.) et PRICER (W. E. jr.). — *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 5702 (1956).
224. RABINOWITZ (J. C.) et PRICER (W. E. jr.). — *J. Biol. Chem.*, **218**, 189 (1956).
225. RABINOWITZ (J. C.) et PRICER (W. E. jr.). — *J. Biol. Chem.*, **222**, 537 (1956).
226. RAUEN (H. M.) et JAENICKE (L.). — *Z. Physiol. Chem.*, **293**, 46 (1953).
227. RAVEL (J. M.), EAKIN (R. E.) et SHIVE (W.). — *J. Biol. Chem.*, **172**, 67 (1948).
228. REID (J. C.) et LANDEFELD (M. O.). — *Arch. Biochem. Biophys.*, **34**, 219 (1951).
229. REID (J. C.), TEMMER (O. S.) et BAGON (M. O.). — *J. Natl. Cancer Inst.*, **17**, 189 (1956).
230. REILLY (H. C.). — Ciba Foundation Symposium on Amino Acids and Peptides with Antimetabolic Activity, p. 62. (J. et A. Churchill Ltd., London, 1958).
231. REMY (C. N.), REMY (W. T.) et BUCHANAN (J. M.). — *J. Biol. Chem.*, **217**, 885 (1955).
232. RICCERI (G.). — *Boll. Soc. ital. biol. sper.*, **32**, 274 (1956).
233. RICCERI (G.). — *Boll. Soc. ital. biol. sper.*, **32**, 277 (1956).
234. RICCERI (G.). — *Giorn. biochim.*, **5**, 328 (1956).
235. RICCERI (G.). — *Giorn. biochim.*, **5**, 341 (1956).
236. ROBINSON (W. G.). — 4^e Congrès Intern. Biochimie, Vienne (Autriche) 1958. Résumés des Communications, p. 50.
237. ROCHE (J.), THOAI (Ng.-V.) et GLAHN (P. E.). — *Experientia*, **8**, 428 (1952).
238. ROSE (W. C.). — *Physiol. Revs.*, **3**, 544 (1923).
239. ROSE (W. C.) et COOK (K. G.). — *J. Biol. Chem.*, **64**, 325 (1925).
240. ROTHBERG (S.) et HAYAISHI (O.). — *J. Biol. Chem.*, **229**, 897 (1957).
241. RYDON (H. N.) et SMITH (P. W. G.). — *Nature*, **169**, 922 (1952).
242. RYKHLIK (I.), SHVEITSAR (Y.) et SHORM (F.). — *Doklady Acad. Nauk. S.S.S.R.*, **104**, 283 (1955).
243. SAGERS (R. D.), BECK (J. V.), GRUBER (W.) et GUNSALUS (I. C.). — *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 694 (1956).
244. SALZMAN (N. P.), EAGLE (H.) et SEBRING (E. D.). — *J. Biol. Chem.*, **230**, 1001 (1958).
245. SCHAYER (R. W.). — *Brit. J. Pharmacol.*, **11**, 472 (1956).
246. SCHAYER (R. W.), COOPER (J. A. D.), SMILEY (R. L.) et DAVIS (K. J.). — *J. Appl. Physiol.*, **9**, 481 (1956).
247. SCHAYER (R. W.), KARJALA (S. A.), DAVIS (K. J.) et SMILEY (R. L.). — *J. Biol. Chem.*, **221**, 307 (1956).
248. SCHULMAN (M. P.). — Chemical Pathways of Metabolism, vol. II, p. 224. (Academic Press, New York, 1954).
249. SCHULMAN (M. P.) et BUCHANAN (J. M.). — *Federation Proc.*, **10**, 244 (1951).
250. SCHULMAN (M. P.) et BUCHANAN (J. M.). — *J. Biol. Chem.*, **196**, 513 (1952).
251. SCHULMAN (M. P.), BUCHANAN (J. M.) et MILLER (C. S.). — *Federation Proc.*, **9**, 225 (1950).
252. SCHULMAN (M. P.), SONNE (J. C.) et BUCHANAN (J. M.). — *J. Biol. Chem.*, **196**, 499 (1952).

253. SEEGMILLER (J. E.), LASTER (L.), LIDDLE (L. V.) et STETTEN (D. W. jr.). — 4^e Congrès Intern. Biochimie, Vienne (Autriche) 1958. Résumés des Communications, p. 172.
254. SEEGMILLER (J. E.), LASTER (L.) et STETTEN (D. W. jr.). — *J. Biol. Chem.*, **216**, 653 (1955).
255. SEEGMILLER (J. E.), SILVERMAN (M.), TABOR (H.) et MEHLER (A. H.). — *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 6205 (1954).
256. SEVAG (M. G.) et STEWART (R. C.). — *Arch. Biochem. Biophys.*, **41**, 14 (1952).
257. SHAW (E.). — 4^e Congrès Intern. Biochimie, Vienne (Autriche) 1958. Résumés des Communications, p. 6.
258. SHEMAIN (D.) et RITTENBERG (D.). — *J. Biol. Chem.*, **167**, 875 (1947).
259. SHIVE (W.). — *J. Cellular Comp. Physiol.*, **38**, suppl. 1, 203 (1951).
260. SHIVE (W.), ACKERMANN (W. W.), GORDON (M.), GETZENDANER (M. E.) et EAKIN (R. E.). — *J. Am. Chem. Soc.*, **69**, 725 (1947).
261. SHIVE (W.) et ROBERTS (E. C.). — *J. Biol. Chem.*, **162**, 463 (1946).
262. SILVERMAN (M.), GARDINER (R. C.) et BAKERMAN (H. A.). — *J. Biol. Chem.*, **194**, 815 (1952).
263. SILVERMAN (M.), KERESZTESY (J. C.), KOVAL (G. J.) et GARDINER (R. C.). — *J. Biol. Chem.*, **226**, 83 (1957).
264. SIVARAMAKRISHNAN (V. M.) et SARMA (P. S.). — *Current Sci. (India)*, **25**, 288 (1956).
265. SKIPPER (H. E.). — Canadian Cancer Conference, vol. 1, p. 354 (Academic Press, New York, 1955).
266. SKIPPER (H. E.), BENNETT (L. L. jr.) et SCHABEL (F. M. jr.). — *Federation Proc.*, **13**, 298 (1954).
267. SLOANE (N. H.), BARG (W. F. jr.), BOGGIANO (E.), COULOMB (B.) et HUTCHINGS (B. L.). — *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 4497 (1956).
268. SLOTNICK (I. J.) et SEVAG (M. G.). — *Arch. Biochim. Biophys.*, **57**, 491 (1955).
269. SOUCY (R.) et BOUTHILLIER (L. P.). — *Rev. can. biol.*, **10**, 290 (1951).
270. SONNE (J. C.), BUCHANAN (J. M.) et DELLUVA (A. M.). — *J. Biol. Chem.*, **166**, 395 (1946).
271. SONNE (J. C.), BUCHANAN (J. M.) et DELLUVA (A. M.). — *J. Biol. Chem.*, **173**, 69 (1948).
272. SONNE (J. C.), LIN (I.) et BUCHANAN (J. M.). — *J. Biol. Chem.*, **220**, 369 (1956).
273. SPIZIZEN (J.), KENNEY (J. C.) et HAMPIL (B.). — *J. Bacteriol.*, **62**, 323 (1951).
274. SPRINSON (D. B.). — *J. Biol. Chem.*, **178**, 529 (1949).
275. SPRINSON (D. B.) et RITTENBERG (D.). — *J. Biol. Chem.*, **198**, 655 (1952).
276. STEGWE (D.). — *Acta Botan. Neerl.*, **4**, 575 (1955).
277. STETTEN (M. R.) et FOX (C. L.). — *J. Biol. Chem.*, **161**, 333 (1945).
278. STEWART (R. C.) et SEVAG (M. G.). — *Arch. Biochem. Biophys.*, **41**, 9 (1952).
279. STEWART (R. C.) et SEVAG (M. G.). — *Federation Proc.*, **12**, 275 (1953).
280. STOCK (C. C.), REILLY (H. C.), BUCKLEY (S. M.), CLARKE (D. A.) et RHOADS (C. P.). — *Nature*, **173**, 71 (1954).
281. SUTTON (W. B.), SCHLENK (F.) et WERKMAN (C. H.). — *Arch. Biochem. Biophys.*, **32**, 85 (1951).

282. TABOR (H.). — *J. Biol. Chem.*, **188**, 125 (1951).
283. TABOR (H.) et HAYAISHI (O.). — *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 505 (1955).
284. TABOR (H.) et MEHLER (A. H.). — *J. Biol. Chem.*, **210**, 559 (1954).
285. TABOR (H.), MEHLER (A. H.) et SCHAYER (R. W.). — *J. Biol. Chem.*, **200**, 605 (1953).
286. TABOR (H.) et RABINOWITZ (J. C.). — *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 5705 (1956).
287. TESAR (C.) et RITTENBERG (D.). — *J. Biol. Chem.*, **170**, 35 (1947).
288. TESHIMA (J.) et MIZUNO (K.). — *Nagoya Sangyô Kagaku Kenkyûjo Kenkyû Hôkoku*, **9**, 60 (1956).
289. THIERSCH (J. B.). — *Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med.*, **94**, 27 (1957).
290. THOAI (Ng.-V.), GLAHN (P. E.), HEDEGAARD (J.), MANCHON (P.) et ROCHE (J.). — *Biochim. Biophys. Acta*, **15**, 87 (1954).
291. THOAI (Ng.-V.), GLAHN (P. E.), HEDEGAARD (J.), MANCHON (P.) et ROCHE (J.). — *Biochim. Biophys. Acta*, **19**, 569 (1956).
292. TOMISEK (A. J.), KELLY (H. J.) et SKIPPER (H. E.). — *Arch. Bio-phys.*, **64**, 437 (1956).
293. TOTTER (J. R.) et BEST (A. N.). — *Arch. Biochem. Biophys.*, **54**, 318 (1955).
294. WACHSMAN (J. T.) et BARKER (H. A.). — *J. Bacteriol.*, **69**, 83 (1955).
295. WACKER (A.), GRISEBACH (H.), TREBST (A.), EBERT (M.) et WEYGAND (F.). — *Angew. Chem.*, **66**, 712 (1954).
296. WACKER (A.) et WEYGAND (F.). — 3^e Congrès Intern. Biochimie, Bruxelles 1955. Résumés des Communications, p. 91.
297. WAELSCH (H.) et MILLER (A.). — Dans McElroy, W.D. et Glass, H.B. : Symposium on Amino Acid Metabolism, p. 407. (The Johns Hopkins Press, Baltimore, U.S.A., 1955).
298. WARREN (L.) et BUCHANAN (J. M.). — *J. Biol. Chem.*, **229**, 613 (1957).
299. WARREN (L.), FLAKS (J. C.) et BUCHANAN (J. M.). — *J. Biol. Chem.*, **229**, 627 (1957).
300. WAY (J. L.) et MANDEL (H. G.). — *Federation Proc.*, **14**, 300 (1955).
301. WEAVER (J. M.) et SHIVE (W.). — *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 4628 (1953).
302. WEBB (M.). — *Biochim. Biophys. Acta*, **17**, 212 (1955).
303. WEBB (M.) et NICKERSON (W. J.). — *J. Bacteriol.*, **71**, 140 (1956).
304. WELCH (A. D.) et NICHOL (C. A.). — *Ann. Rev. Biochem.*, **21**, 633 (1952).
305. WELCH (H.), PUTNAM (L. E.) et RANDALL (W. A.). — *Antib. Med.*, **1**, 72 (1955).
306. WERKHEISER (W. C.), WINZLER (R. J.) et VISSER (D. W.). — *Cancer Research.*, **15**, 641 (1955).
307. WHEELER (G. P.), SCHABEL (F. M. jr.) et SKIPPER (H. E.). — *Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med.*, **92**, 396 (1956).
308. WHITELEY (H. R.), OSBORN (M. J.) et HUENNEKENS (F. M.). — *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 757 (1958).
309. WILLIAMS (W. J.). — *Federation Proc.*, **10**, 270 (1951).
310. WILLIAMS (W. J.) et BUCHANAN (J. M.). — *Federation Proc.*, **11**, 311 (1952).
311. WILLIAMS (W. J.) et BUCHANAN (J. M.). — *J. Biol. Chem.*, **202**, 253 (1953).

- 312. WITKOP (B.) et KNY (H.). — 4^e Congrès Intern. Biochimie, Vienne (Autriche) 1958. Résumés des Communications, p. 152.
 - 313. WOLF (G.), WU (P. H. L.) et HECK (W. W.). — *J. Biol. Chem.*, **222**, 159 (1956).
 - 314. WOODS (D. D.). — *Brit. J. Exp. Path.*, **21**, 74 (1940).
 - 315. WOODS (D. D.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, **30**, 730 (1948).
 - 316. WOODS (D. D.). — Ciba Foundation Symposium on Chemistry and Biology of Pteridines, p. 220. (J. et A. Churchill Ltd., London, 1954).
 - 317. WOOLLEY (D. W.) et PRINGLE (R. B.). — *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 634 (1950).
 - 318. WRIGHT (B. E.). — *Biochim. Biophys. Acta*, **16**, 165 (1955).
 - 319. WRIGHT (B. E.) et STADTMAN (T. C.). — *J. Biol. Chem.*, **219**, 863 (1956).
 - 320. YAMAMURA (Y.), TANI (J.), TERAJ (T.), KATSUNUMA (N.) et TSUBOI (S.). — *Kekkaku*, **30**, 654 (1955).
 - 321. YOUNG (E. G.), CONWAY (C. F.) et CRANDALL (W. A.). — *Biochem. J.*, **32**, 1138 (1938).
 - 322. ZAHL (P. A.), ALBAUM (H. G.), NOWAK (A. N.), SUESS (D. H.) et KANFER (J. N.). — *Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med.*, **88**, 263 (1955).
-

TABLE DES MATIÈRES.

	Pages
INTRODUCTION.	
Travaux antérieurs sur la biosynthèse des purines	13
1. — Utilisation de précurseurs simples	13
2. — Participation de molécules plus complexes	17
3. — Mécanisme de la biosynthèse des purines	19
4. — Inhibiteurs de la biosynthèse des purines	28
5. — Résumé et Conclusions	33
Objet de recherches	35

RECHERCHES PERSONNELLES.

CHAPITRE I.

Conditions optima de biosynthèse de la 4(5)-amino-5(4)-imidazolecarboxamide par <i>Escherichia coli</i>	37
Introduction	37
Conditions générales, Méthodes	39
IA. — Biosynthèse de l'AICA en fonction des conditions de culture	42
Conclusion	48
IB. — Purification et Identification des dérivés de l'AICA formés par <i>Escherichia coli</i>	48
IC. — Formation d'AICA-riboside en fonction de la concentration en D-ribose	52
ID. — Formation d'AICA-ribotide	55
Résumé et Conclusions ..	58

CHAPITRE II.

Synthèse de dérivés de l'Histidine et de la Glycine	61
Introduction	61
A. — Synthèse des métabolites de l'Histidine	62
A1. — Acide formamidinoglutarique	62
A2. — Acide formylglutamique	63
A3. — Acide imidazylacétique	63
A4. — Acide imidazylpyruvique	64

B. — Synthèse des dérivés de la glycine	64
B1. — Formylglycine	64
B2. — Glycinamide	65
B3. — Formylglycinamide	65
B4. — Formiminoglycine	66

CHAPITRE III.

Influence de l'histidine et de ses métabolites sur la biosyn- thèse des purines par <i>Escherichia coli</i>	68
Conditions générales, Méthodes	68
A. — Inhibition par la sulfadiazine	74
1. — Rapports généraux	74
2. — Mécanisme général	80
3. — Mécanisme d'activation de la formation d'AICA	84
Résumé et Conclusions	91
B. — Inhibition par l'azaserine	92
Expérimentation préalable	94
1. — Rapports généraux	96
2. — Mécanisme général	97
3. — Inhibition en fonction du supplément	101
4. — Inhibition en fonction de l'inhibiteur	103
5. — Métabolisme de l'histidine	105
6. — Mode d'action de l'histidine	107
7. — Intermédiaires	110
Résumé et Conclusions	112
RÉSUMÉ GÉNÉRAL	114
CONCLUSIONS GÉNÉRALES	117
FORMULES ET ABRÉVIATIONS	122
BIBLIOGRAPHIE	133
TABLE DES MATIÈRES	145

DEUXIÈME THÈSE.

Propositions données par la Faculté :

L'état actuel du problème
du mécanisme hydrolasique des estérases

Vu et approuvé :

Paris, le 7 avril 1959.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

J. PERES.

Vu

et Permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

Jean SARRAILH.



Achevé d'imprimer le 5 septembre 1959.

Imprimerie M. DECLUME, Lons-le-Saunier — 346-59-400.
Septembre 1959 « Dépôt légal 3^e trimestre 1959 — N° 4964 ».

